

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los  
Alimentos**



**FUENTES DE BACTERIAS PARA LA  
COLONIZACIÓN DEL INTESTINO DEL  
NEONATO: APLICACIÓN PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA MASTITIS  
LACTACIONALES.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Esther A. Jiménez Quintana**

Bajo la dirección de los doctores

Juan Miguel Rodríguez Gómez  
Leónides Fernández Álvarez

**Madrid, 2010**

- ISBN: 978-84-692-9924-1

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA

**FUENTES DE BACTERIAS PARA LA COLONIZACIÓN  
DEL INTESTINO DEL NEONATO. APLICACIÓN PARA  
EL TRATAMIENTO DE LAS MASTITIS  
LACTACIONALES**



TESIS DOCTORAL

ESTHER A. JIMÉNEZ QUINTANA

Madrid, 2009



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**FUENTES DE BACTERIAS PARA LA COLONIZACIÓN DEL INTESTINO  
DEL NEONATO. APLICACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE LAS  
MASTITIS LACTACIONALES**

Memoria que para optar al grado de  
Doctor, con mención honorífica  
“*Doctorado Europeus*”, presenta la  
Licenciada Esther A. Jiménez Quintana

Madrid, febrero de 2009



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA  
28040 MADRID

JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ, PROFESOR TITULAR DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA Y LEÓNIDES FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, PROFESORA TITULAR DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Fuentes de bacterias para la colonización del intestino del neonato. Aplicación para el tratamiento de las mastitis lactacionales”, de la que es autora la Licenciada Esther A. Jiménez Quintana, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con mención honorífica “*Doctorado Europeus*”.

Madrid, 17 de febrero de 2009

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Juan Miguel Rodríguez Gómez

Leónides Fernández Álvarez



*A mi familia*





*Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, con su ayuda, han hecho posible la realización de este trabajo.*

*En primer lugar a Lorenzo de la Hoz y Dolores Selgas, directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos durante el periodo de realización de este trabajo de investigación, por vuestra amabilidad y por estar siempre disponibles para la firma de ese sinfín de documentos imprescindibles en esta Tesis.*

*A mis directores de Tesis, por su gran calidad humana, siempre preocupados por el estado de “sus” becarios, tanto laboral como personal, virtud que se refleja incluso en las líneas de investigación que está desarrollando el grupo: el problema de las mastitis, el VIH, la obesidad infantil, etc. A Juan Miguel Rodríguez que con su conocimiento y sus buenas ideas me ha llevado a introducirme en este mundo de la curiosidad, el de la investigación. Gracias por tu experiencia que me ha guiado durante todos los experimentos y por las buenas relaciones que tienes con tantas personas de todos los ámbitos, sin las cuales, quizá, esta Tesis no hubiera podido llevarse a cabo. A Leonides Fernández por estar siempre a mi lado y dedicarme tiempo a pesar de no disponer de él. Agradezco tu paciencia y meticulosidad, tanto para trabajar en el laboratorio como para escribir la memoria de este trabajo. De ti he aprendido a hacer de “MacGyver” y encontrar o inventar todos los recursos necesarios para la realización de los experimentos. Gracias por llevarme en coche allí donde he necesitado, sobretodo por acompañarme al 12 de Octubre a por muestras al mediodía, no olvidaré nuestras conversaciones (a veces sobre el trabajo, normalmente sobre la vida) durante esas breves excursiones.*

*A las personas que forman o que han formado parte del grupo de investigación. A María, por las siembras interminables de muestras que ha hecho por mí o conmigo y por todos los artículos que me ha conseguido durante la Tesis. A Rocío, porque aunque nuestra amistad surgió tarde, ahora ya no hay quien la rompa y has estado a mi lado desde entonces, incluso ahora en la distancia, con tu experiencia y cariño. Muchas gracias por todos tus consejos y por darme tantos ánimos. A Toni y a Susana que aunque no hemos coincidido mucho tiempo, me echasteis una mano durante mis estancias en Norwich. A Susana Delgado y a Antonio Maldonado, becarios post-doctorales, doctores, que me habéis enseñado cómo enfrentarme al difícil mundo de la investigación una vez se ha terminado la Tesis y habéis compartido conmigo vuestros conocimientos en áreas y técnicas diferentes. A mis chicas, Rebeca, Marta y Virginia que me han aguantado y sufrido y que me ayudan en el día a día, ¡espero que nos tomemos muchas cervecitas en El Lagar y nos vayamos mucho de compras!*

*A todos los profesores y becarios del Departamento con los que he compartido visitas a industrias, comidas y alguna que otra salida. Muy especialmente a mi amiga Susana Manzano, apoyo incondicional, cuyo cariño sustituye en parte la falta de familia en Madrid y con la que espero disfrutar de muchas cosas en el futuro. A los becarios “de arriba” tanto antiguos como actuales, los punto LAB y los del fondo. Y en especial quiero agradecer a Luís Asensio su entusiasmo en la docencia de las prácticas, nunca olvidaré tu sonrisa, tu buen humor, tu amabilidad y tus ganas de vivir. A los becarios “de abajo”, a Belén y Juliana con las que he compartido muy buenos momentos además de una permuta de laboratorio y a los demás por su ayuda y su material compartido un millón de veces conmigo. A Alberto “el seguidor” y a Aurora por su eficiencia en la secretaría del Departamento.*

*Gracias a todas las madres que han participado en este trabajo con sus muestras y las de sus hijos y a los profesionales que me han ayudado a llegar hasta ellas, Juan Manuel Odriozola, neonatólogo del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid y Adolfo Gómez-Papí, neonatólogo del Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, entre otros.*

*Gracias a Rosa del Campo por enseñarme todo lo que sabe del PFGE y por acogirme en su laboratorio del Hospital Ramón y Cajal. ¡Ah! Y por los “pinchos-trauma”.*

*Durante 4 meses realicé una estancia en la Universidad de Valencia, en el grupo de Sergi Ferrer al que agradezco que me acogiera en su laboratorio de microbiología enológica y sus enseñanzas sobre taxonomía y vinos. Gracias a Isabel Pardo por su amabilidad y por ayudarme con el PFGE cargándome las muestras en los geles. Durante esta estancia no solo aprendí a afinar en la técnica de PFGE sino que me enseñaron todo acerca del FISF, además conocí a personas maravillosas de las que guardo muy buen recuerdo, Rosario, Sara y los chicos de las micotoxinas. Y a Lucía, muchas gracias por enseñarme donde estaba todo, no sólo en el laboratorio sino también en Valencia, ¡ah! y por descubrirme el cava valenciano, he ganado una buena amiga.*

*A todas las personas que he conocido durante mis estancias en Norwicih. A Arjan Narbad por acogirme en su laboratorio y estar pendiente de mí en todo momento. A Nikki Horn por enseñarme a ser meticulosa y perfeccionista con todo lo que se realiza en un laboratorio, gracias por tus consejos. A Carmen Palop, a Diane y al resto de compañeros del departamento por tratarme como a uno más y contar conmigo en los cafés, comidas, cenas, etc. A Carmen Pin, por su ayuda en los pequeños intríngulis de la estadística y por las cervecitas que junto con Julia y Arantxa hemos compartido con unas risas en los pubs de Norwich. A Molly, por haberme tratado como a una hija (o como a una reina) en su casa y por las largas conversaciones que tanto inglés me han hecho aprender.*

*A Paco, tú fuiste el que me dio la idea y el empujón que necesitaba para que hiciera una Tesis Doctoral, sin ti, quizás todavía no sería ni siquiera Licenciada. Muchas gracias por tu paciencia durante mis estancias, por hacer encaje de bolillos para estar conmigo cada vez que me he ido fuera. Gracias por tu apoyo y comprensión durante todos estos años, por enseñarme parte del mundo y a abrir la mente respecto a él y no encerrarme en una ciudad o Comunidad Autónoma. Gracias por tu amor. A mi familia política, Paco, Amalia, María, Enrique, Ana y Marta, por hacerme un hueco en sus corazones y por su gran cariño.*

*A mi familia, por su apoyo y cariño. Gracias a mis padres, Felipe y Lidia, que han trabajado muy duro toda su vida para que sus hijos tengan una vida mejor y más fácil que la que ellos han tenido. Gracias por vuestro sacrificio continuo. A mis hermanos Conrado y Cipri por llevarme, traerme y aguantar mis caprichos de niña mimada, gracias por preocuparos de mí y de mi educación, por demostrarme que siempre estaréis a mi lado, pase lo que pase. A mis cuñadas, Antonia que me ha enseñado lo importante que es la familia y a estar pendiente de ella entre otras cosas; a M<sup>a</sup> José, por mostrarme la vida desde otra perspectiva distinta y a intentar vivirla al máximo. A mis sobrinos: Guillermo, el mayor, del que he disfrutado más tiempo; Gerard, el niño más cariñoso que conozco; Óscar, el que más se parece a mí físicamente, Berta y Arnau, los mellizos que junto con Óscar son el centro de atención de la casa, a todos por querer tanto a su tita Esther a pesar de no poder dedicarles todo el tiempo que me gustaría. A mi Ina y a Manolo, mis otros padres, por cuidarme siempre, por vuestra comprensión y tolerancia, gracias por quererme tanto. Y al resto de mi familia, a mis abuelos, tíos y primos, de los que siempre he recibido la idea de la voluntad de superación, intentar llegar más lejos que las generaciones anteriores de la familia, además de su apoyo y cariño.*

*Al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme la beca predoctoral que me ha permitido realizar esta Tesis.*

## **RESUMEN**



---

## **RESUMEN**

### **1. Aislamiento de bacterias con ensales de sangre del cordón umbilical y meconio de niños sanos**

Inicialmente se procedió al aislamiento de bacterias en muestras de sangre del cordón umbilical y meconio de niños sanos para investigar la posible transferencia prenatal de bacterias entre el intestino materno y el feto. Las muestras se inocularon en diversos medios de cultivo, con o sin un enriquecimiento previo. Todos los aislados pertenecían a los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* o *Propionibacterium*. La existencia de la transferencia bacteriana se confirmó en un modelo animal. Concretamente, a un grupo de ratonas gestantes se les administró por vía oral una cepa de *E. faecium* que se había aislado originalmente de leche humana y a la que se le había introducido un marcaje genético. La cepa marcada se detectó mediante PCR y se pudo aislar en muestras de líquido amniótico y de meconio fetal obtenidas mediante cesárea el día anterior a la fecha prevista para el parto.

### **2. Diversidad bacteriana en el calostro humano y análisis de posibles factores de virulencia en las cepas de estafilococos y enterococos**

En el momento de iniciar este estudio, la composición bacteriológica del calostro humano era totalmente desconocida. Por ello, el objetivo de esta parte de la Tesis Doctoral fue determinar la diversidad bacteriana en 36 muestras de calostro obtenidas de mujeres sanas. *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis* fueron las especies dominantes, seguidas de *Streptococcus mitis*, *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus lugdunensis*. Seguidamente, se obtuvo el perfil genético de todos los estafilococos y enterococos aislados y se seleccionó un representante de cada perfil para el análisis de determinantes de virulencia y de la sensibilidad a diversos antibióticos. Los genes *icaD* (asociado a la formación de biofilms) y *mecA* (resistencia a meticilina) fueron detectados, respectivamente, en 11 y 6 de las 48 cepas de *S. epidermidis*. Por otra parte, ninguna de las 10 cepas enterocócicas analizadas contenían los genes *cylA*, *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* o *vanG*. Todas las cepas fueron sensibles a la vancomicina, entre otros muchos antibióticos. Globalmente, los resultados obtenidos indican que el calostro de mujeres sanas no contiene bacterias patógenas.

### **3. *Staphylococcus epidermidis* constituye un rasgo diferencial de la microbiota fecal de niños amamantados**

La leche humana es una fuente importante de bacterias para el intestino infantil. El objetivo de este trabajo fue el análisis de la diversidad bacteriana en heces de niños alimentados mediante lactancia materna exclusiva (n=16) y su comparación con la de niños alimentados con fórmula (n=7). Se tomaron muestras de heces en los días 7, 14 y 35. Además, en esos mismos días se tomaron muestras de leche de las 16 madres del grupo de lactancia materna. Se identificaron un total de 1.210 aislados (489 de leche, 531 de heces del grupo de lactancia y 190 de heces del grupo de fórmula). *Staphylococcus epidermidis* fue la especie predominante en leche y heces de los niños amamantados mientras que su prevalencia fue mucho más baja en las heces de los niños alimentados con fórmulas. *Enterococcus faecalis* fue la segunda especie más abundante en las muestras de los niños amamantados pero, en este caso, también estaba presente en todas las muestras del grupo de fórmula. Seguidamente, se obtuvo el perfil genético de todos los estafilococos y enterococos aislados y se seleccionó un representante de cada perfil para el análisis de determinantes de virulencia y de la sensibilidad a diversos antibióticos. Los genes *icaD* y *mecA* sólo fueron detectados en un porcentaje muy bajo de las cepas de *S. epidermidis*. Por otra parte, ninguna de las cepas enterocócicas analizadas contenían los genes *cylA*, *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* o *vanG*. Todas las cepas fueron sensibles a la vancomicina. En conclusión, *S. epidermidis* constituye un rasgo diferencial de la microbiota fecal de los niños alimentados mediante lactancia materna y prácticamente todas las cepas de estafilococos y enterococos analizadas pueden considerarse seguras para la población infantil.

### **4. Aislamiento de bifidobacterias en leche humana y análisis de la población bifidobacteriana mediante PCR-DGGE y qRTi-PCR**

El objetivo de este trabajo fue determinar si la leche humana contiene bifidobacterias y, en tal caso, si pueden ser transmitidas al intestino infantil. En total, participaron 23 mujeres y sus respectivos hijos, que proporcionaron una muestra de leche y heces, respectivamente, entre los días 4 y 7 tras el nacimiento. Los aislados Gram-positivos y catalasa-negativos cuyas células mostraban una morfología típicamente bifidobacteriana se identificaron a nivel de especie mediante la prueba de

la F6PPK y por secuenciación del gen 16S rDNA. Se detectaron bifidobacterias, pertenecientes a las especies *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis* y/o *B. bifidum*, en las muestras de leche de 8 mujeres. Paralelamente, se aislaron esas mismas especies, más *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*, a partir de 21 muestras de heces. El análisis por PCR-DGGE reveló la presencia de entre 1 y 4 bandas bifidobacterianas dominantes en 22 muestras de leche. En esas mismas muestras se pudo detectar DNA bifidobacteriano mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRTi-PCR) en un rango de entre 40 y 10.000 copias del gen 16S rRNA/ml. En conclusión, la leche humana parece ser una fuente de bifidobacterias para el intestino infantil.

## **5. Administración oral de dos lactobacilos aislados de leche humana para el tratamiento de mastitis estafilocócicas durante la lactancia**

El último objetivo de esta Tesis consistió en la aplicación de dos lactobacilos aislados de leche humana para el tratamiento de las mastitis lactacionales, procesos infecciosos causados principalmente por estafilococos y estreptococos que suponen una de las principales causas médicas de destete precoz e indeseado. La antibioterapia únicamente logra la curación del 10-30% de los casos. En el ensayo participaron 20 mujeres lactantes a las que se les había diagnosticado una mastitis estafilocócica. El grupo “probiótico” (n=10) recibió una cápsula diaria con *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 y *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 ( $10^9$  ufc de cada una) durante 4 semanas. El otro grupo (n=10) recibió una cápsula que únicamente contenía el excipiente. La mejoría de las mujeres del grupo “probiótico” fue progresiva a lo largo del tratamiento y se reflejó en una disminución significativa del recuento de estafilococos, un aumento del de lactobacilos y la desaparición de la sintomatología. Las cepas administradas se pudieron detectar en la leche a partir de la segunda semana de tratamiento. En consecuencia, la aplicación de estas cepas constituye una alternativa para el tratamiento de las mastitis lactacionales.



## **SUMMARY**

### **1. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood and meconium of healthy neonates**

To elucidate if a prenatal mother-to-child efflux of commensal bacteria may exist, presence of bacteria in umbilical cord's blood and meconium of healthy neonates born was investigated. The samples were inoculated onto agar plates. All the identified isolates belonged to the genera *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* or *Propionibacterium*. To confirm such bacterial transfer, a group of pregnant mice were orally inoculated with a genetically-labelled *E. faecium* strain previously isolated from breast milk of a healthy woman. The labelled strain could be isolated and PCR-detected from meconium and amniotic fluid of the inoculated animals. In contrast, it could not be detected in the samples obtained from a non-inoculated control group.

### **2. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors**

In contrast to breast milk, little is known about the bacterial composition of human colostrum. The objective of this work was to analyse the bacterial diversity of colostrum obtained from healthy women and to characterize the dominant bacterial species for the presence of possible virulence factors. Samples of colostrum obtained from 36 healthy women were inoculated in different culture media. Several isolates from each medium were selected and identified. Staphylococcal and enterococcal isolates were submitted to genetic profiling. A representative of each profile was included into a genetic and phenotypic characterization scheme, including detection of potential virulence traits/genes and sensitivity to antibiotics. *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* were the dominant species, followed by *Streptococcus mitis*, *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus lugdunensis*. Among the 48 *S. epidermidis* isolates selected on the basis of their genetic profiles, the biofilm-related *icaD* gene and the *mecA* gene were detected in only 11 and 6 isolates, respectively. Parallel, 10 enterococcal isolates were also characterized and none of them contained the *cylA*, *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* and *vanG* genes. All of them were sensitive to vancomycin. There were no indications that the colostrum samples contained harmful bacteria.

### **3. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants**

Breast milk is an important source of staphylococci and other bacterial groups to the infant gut. The objective of this work was to analyse the bacterial diversity in feces of breast-fed infants and to compare it with that of formula-fed ones. A total of 23 women and their respective infants (16 breast-fed and 7 formula-fed) participated in the study. The 16 women and their infants provided a sample of breast milk and feces, respectively, at days 7, 14, and 35. The feeding practice had a significant effect on bacterial counts. A total of 1,210 isolates (489 from milk, 531 from breast-fed and 190 from formula-fed infants) were identified. *Staphylococcus epidermidis* was the predominant species in milk and feces of breast-fed infants while it was less prevalent in those of formula fed-infants. *Enterococcus faecalis* was the second predominant bacterial species among the fecal samples provided by the breast-fed infants but it was also present in all the samples from the formula-fed ones. Staphylococcal and enterococcal isolates were submitted to genetic profiling and to a characterization scheme, including detection of potential virulence traits and sensitivity to antibiotics. The biofilm-related *icaD* gene and the *mecA* gene were only detected in a low number of the *S. epidermidis* strains. Several enterococcal isolates were also characterized and none of them contained the *cylA* or the *vanABDEG* antibiotic-resistance genes. All were sensitive to vancomycin. In conclusion, the presence of *S. epidermidis* is a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. Globally, the staphylococcal isolates obtained from milk and feces of breast-fed infants contain a low number of virulence determinants and are sensitive to most of the antibiotics tested.

### **4. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-DGGE and qRTi-PCR**

The objective of this work was to elucidate if breast milk contains bifidobacteria and whether they can be transmitted to the infant gut through breastfeeding. Twenty-three women and their respective infants provided samples of breast milk and feces, respectively, at day 4-7 after birth. Gram-positive and catalase-negative isolates from specific media with a typical bifidobacterial shape were identified to genus level by F6PPK assays and to species level by 16S rRNA gene

sequencing. Bifidobacterial communities in breast milk were assessed by PCR-DGGE and their levels were estimated by quantitative-real time PCR (qRTi-PCR). Bifidobacteria were present in 8 milk samples and 21 fecal samples. *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis* and *B. bifidum* were isolated from milk, while infant feces also contained *B. longum* and *B. pseudocatenulatum*. PCR-DGGE revealed the presence of 1-4 bifidobacterial dominant bands in 22 milk samples. Sequences with similarities above 98% were identified as *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum* and *B. dentium*. Bifidobacterial DNA could be detected by qRTi-PCR in the same 22 milk samples in a range between 40 and 10,000 16S rRNA gene copies per ml. In conclusion, human milk seems to be a source of living bifidobacteria to the infant gut.

#### **5. Oral administration of lactobacilli strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation**

In this study, 20 women with staphylococcal mastitis were randomly divided in two groups. Those in the probiotic group daily ingested  $10 \log_{10}$  cfu of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 and the same quantity of *Lactobacillus gasseri* CECT5714 for 4 weeks while those in the control one only ingested the excipient. Both lactobacilli were originally isolated from breast milk. On day 0, the mean staphylococcal counts in the probiotic and control groups were similar ( $4.74$  and  $4.81 \log_{10}$  cfu/mL, respectively) but lactobacilli could not be detected. On day 30, the mean staphylococcal count in the probiotic group ( $2.96 \log_{10}$  cfu/mL) was lower than that of the control group ( $4.79 \log_{10}$  cfu/mL). *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714 were isolated from the milk samples of 6 of the 10 women of the probiotic group. At day 14, no clinical signs of mastitis were observed in the women assigned to this group but persisted throughout the study period in control group women. In conclusion, *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714 appear to be an efficient alternative for the treatment of lactational infectious mastitis during lactation.

## ÍNDICE



	<b><u>Página</u></b>
<b>CAPÍTULO I. Exposición general del tema a investigar</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II. Introducción general</b>	<b>7</b>
<b>II.1. Desarrollo embrionario y fetal</b>	<b>9</b>
II.1.1. Primera semana del desarrollo	9
II.1.2. Segunda semana del desarrollo	13
II.1.3. Desarrollo de la placenta	15
II.1.4. Gastrulación	19
II.1.5. Periodo fetal	20
II.1.6. Compatibilidad materno-fetal	22
II.1.7. Parto	23
<b>II.2. Cambios fisiológicos durante el embarazo</b>	<b>25</b>
II.2.1. Cambios generales	26
II.2.2. Cambios en el aparato digestivo	28
II.2.3. Cambios en la glándula mamaria	29
<b>II.3. Lactancia</b>	<b>32</b>
II.3.1. Fisiología de la lactancia	32
II.3.1.1. Prolactina	33
II.3.1.2. Oxitocina	34
II.3.1.3. Factor inhibidor de la lactancia (FIL)	34
II.3.1.4. Mecanismos celulares para la síntesis y la secreción de la leche	35
II.3.2. Calostro: composición y funciones fisiológicas	39
II.3.3. Leche materna: composición y funciones biológicas	42
II.3.4. Fórmulas infantiles	46
II.3.5. El vínculo “intestino materno-glándula mamaria-intestino neonatal	48
<b>II.4. Translocación bacteriana en el intestino materno</b>	<b>53</b>
II.4.1. Definición de translocación	53
II.4.2. Mecanismos de translocación	53
II.4.3. Implicaciones	55
<b>II.5. La circulación entero-mamaria</b>	<b>56</b>
<b>II.6. Relaciones entre bacterias y sistema inmunitario</b>	<b>58</b>
<b>II.7. Fisiología digestiva del neonato</b>	<b>62</b>
II.7.1. Meconio	62

	<b><u>Página</u></b>
II.7.2. Colonización del intestino infantil	63
<b>II.8. Problemas microbiológicos durante la lactancia: la mastitis infecciosa</b>	66
II.8.1. ¿Qué se entiende por mastitis?	66
II.8.2. Agentes etiológicos causantes de mastitis infecciosas	67
II.8.3. Factores predisponentes	70
II.8.4. Impacto de las mastitis infecciosas en el lactante	72
<b>II.9. Probióticos para el binomio madre-hijo</b>	73
II.9.1. Gastroenteritis infecciosa aguda	73
II.9.2. Diarreas asociadas a antibioterapia	74
II.9.3. Enfermedades alérgicas	74
II.9.4. Probióticos y prematuros	76
II.9.5. Probióticos para mujeres embarazadas y lactantes	79
<b>CAPÍTULO III. Aislamiento de bacterias comensales de cordones umbilicales procedentes de recién nacidos sanos mediante cesárea</b>	81
<b>CAPÍTULO IV. ¿Es el meconio de los recién nacidos sanos estéril?</b>	89
<b>CAPÍTULO V. Evaluación de la diversidad bacteriana del calostro humano mediante técnicas dependientes de cultivo. Análisis de las poblaciones estafilocócica y enterocócica</b>	99
<b>CAPÍTULO VI. <i>Staphylococcus epidermidis</i>: un rasgo diferencial de la microbiota fecal de niños amamantados</b>	109
<b>CAPÍTULO VII. Aislamiento de bifidobacterias de leche materna y evaluación de la población de bifidobacterias mediante qRTi-PCR y PCR-DGGE</b>	129
<b>CAPÍTULO VIII. Administración oral de cepas de lactobacilos aisladas de leche materna como tratamiento alternativo de mastitis infecciosas lactacionales</b>	137
<b>CAPÍTULO IX. Discusión general</b>	145
IX.1. ¿Es estéril el feto en el útero?	147
IX.2. Diversidad microbiana en la sangre de cordón umbilical y meconio	149
IX.3. Relevancia de las especies bacterianas presentes en la sangre de cordón umbilical y meconio	150
IX.4. Origen de las especies bacterianas presentes en la sangre de cordón umbilical y meconio	154

---

	<b><u>Página</u></b>
<b>IX.5. El calostro y la leche humana contienen bacterias en condiciones fisiológicas</b>	156
<b>IX.6. <i>Staphylococcus epidermidis</i>: la especie “reina” del calostro y la leche</b>	158
IX.6.1. Producción de <i>biofilms</i>	159
IX.6.2. Resistencia a antibióticos	162
<b>IX.7. La leche humana es una fuente de bifidobacterias para el intestino infantil</b>	165
<b>IX.8. Influencia de la alimentación en la microbiota intestinal de niños recién nacidos</b>	166
<b>IX.9. Características de las principales bacterias comensales de las heces de los recién nacidos</b>	169
<b>IX.10. Las mastitis: una causa evitable del destete precoz</b>	173
<b>IX.11. Tratamiento de las mastitis con probióticos</b>	176
<b>CAPÍTULO X. CONCLUSIONES</b>	181
<b>CAPÍTULO XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	187



## **I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR**



Desde los estudios clásicos de Tissier (1900) sobre la adquisición de la microbiota intestinal infantil, se ha aceptado la idea de que los fetos son estériles *in utero* y que la colonización bacteriana del intestino se inicia durante el tránsito por el canal del parto, por contaminación a partir de la microbiota vaginal e intestinal de la madre (Isolauri et al., 2001; Mackie et al., 1999; Tannock, 1995), a pesar de la ausencia de evidencias científicas. Según dicha hipótesis, la composición inicial de la microbiota intestinal estaría determinada fundamentalmente por el tipo de nacimiento, la alimentación del recién nacido y el ambiente que le rodea (Adlerberth et al., 1991; Bettelheim et al., 1974; Brook et al., 1979; Grönlund et al., 1999; Harmsen et al., 2000a; MacGregor y Tunnessen, 1973; Mackie et al., 1999). Por su parte, la principal fuente de bacterias para los niños nacidos por cesárea sería el ambiente hospitalario, incluyendo el instrumental, los equipos y la presencia de otros neonatos y del personal médico (Lennox-King et al., 1976a; 1976b).

Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la existencia de bacterias en muestras de líquido amniótico obtenidas durante embarazos completamente fisiológicos (Bearfield et al., 2002; Buduneli et al., 2005). Paralelamente, otros autores han cuestionado la importancia del tránsito a través del canal vaginal, que tendría, en el mejor de los casos, un papel menor en la colonización bacteriana del neonato. Así, Tannock et al. (1990) observaron que la microbiota vaginal de la madre no se encuentra representada en la microbiota fecal de los recién nacidos. En este mismo sentido, la aplicación de técnicas moleculares al estudio de la posible transmisión vertical de lactobacilos presentes en la vagina de la madre reveló que únicamente una cuarta parte de los neonatos adquirirían lactobacilos maternos en el momento del nacimiento y que, incluso en tales casos, esos lactobacilos eran rápidamente reemplazados por otros lactobacilos asociados a la leche materna (Matsumiya et al., 2002). Precisamente, en estos últimos años también se ha puesto de manifiesto que la leche materna es una fuente constante de bacterias comensales para el intestino del lactante, encontrándose en concentraciones relativamente elevadas ( $\sim 10^3$  ufc/ml) y siendo particularmente rica en estreptococos, estafilococos y bacterias lácticas (Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003).

Todo parece indicar que ciertas bacterias intestinales son capaces de colonizar la glándula mamaria durante el final del embarazo y la lactancia empleando la ruta enteromamaria (Langa, 2006). Más concretamente, las células dendríticas de la lámina

propia intestinal son capaces de abrir las zonas de oclusión entre enterocitos adyacentes, proyectar dendritas al exterior del epitelio y captar células viables, preservando la integridad de la barrera intestinal mediante la expresión de las proteínas que integran las zonas de oclusión (Vazquez-Torres et al., 1999; Rescigno et al., 2001). Una vez captadas, las bacterias podrían propagarse fácilmente a la glándula mamaria ya que durante el final del embarazo y la lactancia existe una colonización selectiva del epitelio de la glándula mamaria por parte de células inmunitarias procedentes del intestino materno (Bertotto et al., 1991).

En resumen, los estudios citados sugieren que existe un flujo de bacterias desde el intestino de las mujeres sanas hacia el de los fetos y neonatos. Inicialmente, existiría un tránsito cuantitativamente pequeño de ciertas especies bacterianas a través de la placenta que permitiría su transferencia al intestino prenatal; posteriormente, se iniciaría una segunda fase en la que el intestino del niño recibiría cantidades mucho más elevadas de bacterias a través del calostro y la leche materna.

Dado que la leche materna es un alimento ingerido por neonatos, el aislamiento en este fluido biológico de bacterias lácticas con propiedades beneficiosas para la salud resultaría particularmente atractivo ya que, por su propia naturaleza, cumplirían algunos de los requisitos generalmente recomendados para bacterias empleadas como probióticos humanos, tales como una ingestión prolongada sin efectos adversos y una total adaptación tanto a mucosas humanas como a ambientes lácteos.

En este contexto, los objetivos de la Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Investigar la posibilidad de que la colonización intestinal se inicie en el periodo fetal. Para ello, se recogerían y analizarían muestras de sangre de cordón umbilical, líquido amniótico y primer meconio durante el nacimiento por parto o cesárea tras un embarazo completamente normal. En caso de detectarse bacterias, se marcarían ciertas cepas y se utilizarían para confirmar la existencia de transferencia intestino materno/placenta y/o intestino materno/intestino fetal en un modelo animal.

2. Determinar la composición bacteriológica del calostro humano empleando técnicas de cultivo. En caso del aislamiento de estafilococos y/o enterococos, se

procedería a analizar su seguridad, incluyendo la presencia o ausencia de determinantes de virulencia y perfil de resistencia a antibióticos.

3. Conocer la influencia de las bacterias existentes en el calostro y la leche humana en el desarrollo y evolución de la microbiota intestinal infantil. Para ello, se compararían los microorganismos existentes en la leche de mujeres sanas y en las heces de sus respectivos hijos, alimentados mediante lactancia materna exclusiva. Además, se compararían los perfiles microbiológicos de las heces de dichos niños con los que se obtuvieran a partir de las heces de un grupo de niños alimentados con fórmula.

4. Conocer si la leche materna es una fuente de bifidobacterias para el intestino infantil, tal y como sucede con las bacterias lácticas. Para ello, se intentaría el aislamiento, identificación y caracterización de bifidobacterias a partir de muestras de leche de mujeres sanas y de las heces de sus respectivos hijos. Se evaluaría la posible transferencia madre-hijo y se estudiaría la diversidad bifidobacteriana de la leche humana empleando técnicas moleculares independientes de cultivo.

5. Aplicar cepas de lactobacilos aisladas de leche humana y seleccionadas por sus propiedades probióticas en el tratamiento de las mastitis, una enfermedad frecuente durante la lactancia, con un origen normalmente infeccioso y que se caracterizan por una disbiosis en la glándula mamaria.



## **II. INTRODUCCIÓN**





## **II.1. DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL**

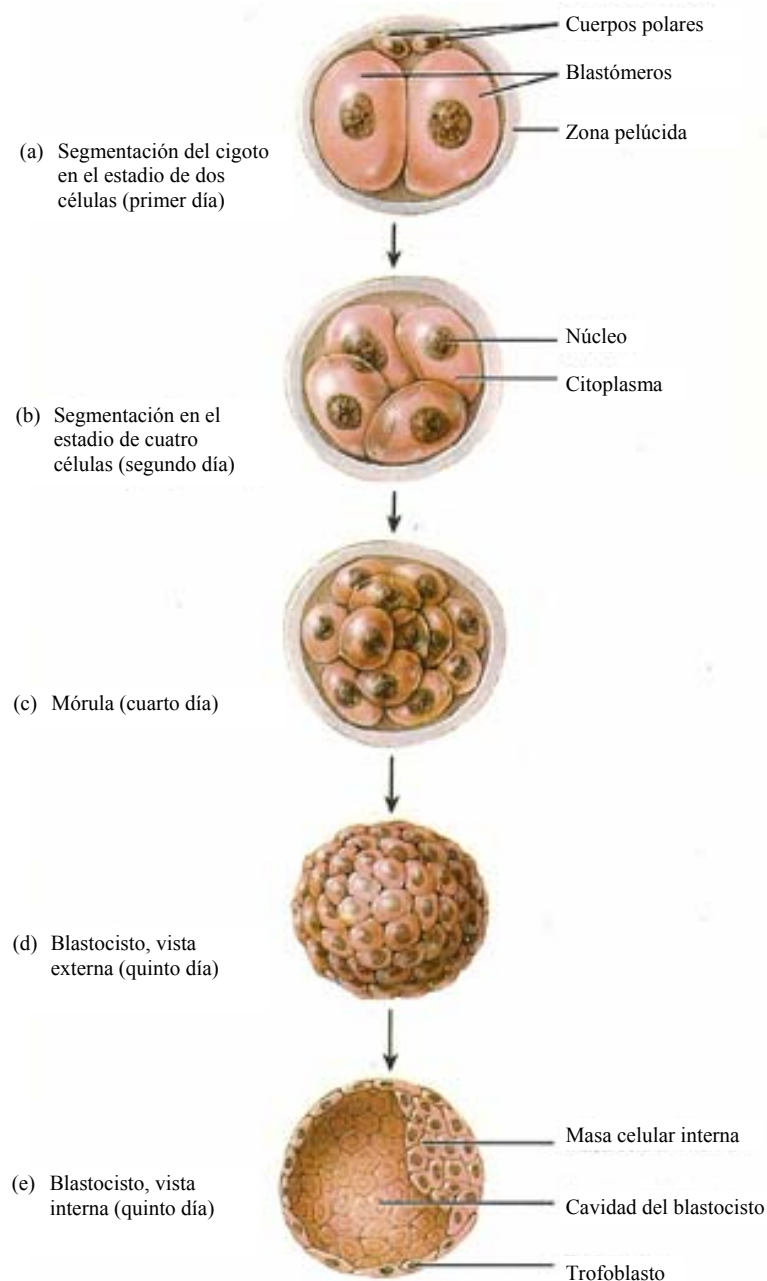
El embarazo es la secuencia de eventos que siguen a la fecundación de un ovocito secundario, que continúan con la implantación y los desarrollos embrionario y fetal, y que, en condiciones normales, finalizan con el nacimiento alrededor de las 38 semanas después de la concepción o de las 40 semanas después del último periodo menstrual. Entre la fecundación y la octava semana de desarrollo, el ser humano se denomina embrión (periodo embrionario) mientras que, entre la novena semana y el nacimiento, recibe el nombre de feto (periodo fetal).

### **II.1.1. Primera semana del desarrollo**

Durante la fecundación los materiales genéticos de un espermatozoide haploide y un ovocito secundario haploide se fusionan para formar un solo núcleo diploide. De esta manera, el óvulo fecundado se transforma en cigoto. Después de la fecundación el cigoto comienza a avanzar desde la trompa de Falopio hacia el útero y, simultáneamente, experimenta divisiones mitóticas rápidas, un proceso conocido como segmentación (Figura 1). La primera división del cigoto se inicia aproximadamente 24 h después de la fecundación y tarda unas 6 h en completarse. Cada división sucesiva se produce de forma más rápida. Así, al segundo día se completa la segunda segmentación y el cigoto pasa a tener cuatro células mientras que al final del tercer día ya contiene 16 células. Las células obtenidas mediante este proceso se denominan blastómeros. Las divisiones sucesivas originan una esfera celular sólida denominada mórula, que mantiene la zona pelúcida y cuyo tamaño es similar al del cigoto original. Ya desde estos primeros momentos existe un intenso diálogo bioquímico entre el embrión y la madre en el que están implicados múltiples intermediarios (hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, factores de transcripción, mediadores lipídicos, enzimas...) (Emiliani et al., 2005; Dey et al., 2004). Este diálogo es imprescindible no sólo para el posterior desarrollo del embrión sino también para la implantación y la placentación.

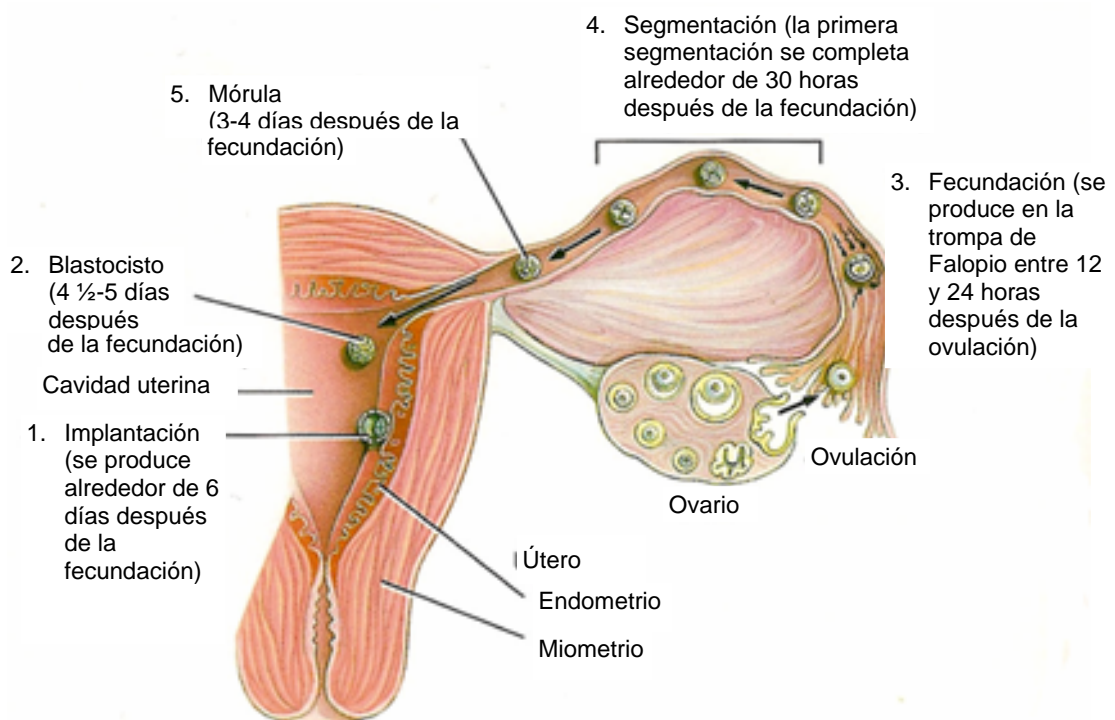
Cuando la mórula llega a la cavidad uterina al cuarto o quinto día, una secreción rica en glucógeno procedente de las glándulas endometriales uterinas penetra

en su interior, se acumula entre los blastómeros y los reorganiza alrededor de una cavidad llena de líquido. De esta manera se origina el blastocisto. La reorganización del blastocisto provoca la formación de dos estructuras específicas: la masa celular interna o embrioblasto, localizada en uno de los polos y a partir de la cual se originará el embrión, y el trofoblasto, una monocapa externa que constituye la pared del blastocisto y que dará lugar a la porción fetal de la placenta.



**Fig. 1.** Segmentación y formación de la mórula y del blastocisto.  
Fuente: Tortora y Derrickson (2008)

El blastocisto permanece libre en el útero durante aproximadamente dos días antes de adherirse a su pared. El blastocisto está bañado externamente por secreciones uterinas que proporcionan al embrión oxígeno y sustratos metabólicos pero pronto este aporte es insuficiente para proseguir su desarrollo. En consecuencia, seis días después de la fecundación, el blastocisto se une con el endometrio en un proceso que se conoce como implantación (Figura 2). Aunque se trata de un proceso continuo, se pueden distinguir tres fases: aposición, adhesión e invasión. En primer lugar, es necesario que el blastocisto se oriente correctamente, con el embrioblasto hacia el endometrio (aposición), y desaparezca la zona pelúcida que le protegía. En ese momento, las células del trofoblasto forman, desde su superficie externa, proyecciones en forma de dedos (*microvilli*) que establecen interdigitaciones con unas microprotrusiones que aparecen en la superficie apical del epitelio endometrial (pinópodos). A continuación, se produce por primera vez el contacto celular entre el blastocisto y la capa epitelial uterina, materializándose la unión entre ambos (adhesión). Finalmente, el blastocisto penetra a través del epitelio y queda inmerso en el estroma uterino (invasión) (Diedrich et al., 2007).



**Fig. 2.** Resumen de los eventos relacionados con la primera semana del desarrollo.  
Fuente: Tortora y Derrickson (2008)

Todo esto sólo puede tener lugar durante un corto periodo de tiempo denominado ventana de implantación (entre los días 20 y 24 del ciclo menstrual), durante el cual el epitelio endometrial experimenta diversos cambios que le confieren propiedades adhesivas (Aplin y Kimber, 2004; Staun-Ram y Shalev, 2005). La regulación de todos estos cambios se debe en gran medida al efecto de los estrógenos y la progesterona que, directa o indirectamente, orquestan la expresión equilibrada de un gran número de genes (Horcajadas et al., 2004).

Una vez producida la implantación, todo el endometrio, a excepción de la capa más profunda, se modifica y recibe el nombre de decidua, ya que se elimina cuando nace el niño. Se suelen distinguir tres partes de la decidua en función de su posición con respecto al blastocisto. La decidua parietal es la porción del endometrio modificado que recubre todo el útero a excepción del área donde se está formando la placenta. La decidua capsular es la porción entre el embrión y la cavidad uterina. Finalmente, la decidua basal es la porción que se encuentra entre el corion y el estrato basal del útero. Esta última parte dará lugar a la parte materna de la placenta.

El proceso de modificación del endometrio recibe el nombre de decidualización y se produce en respuesta a estrógenos, progesterona y mediadores locales generados por el blastocisto, como la prolactina (PRL). Entre las modificaciones más significativas destacan las que afectan a las células del estroma, que se redondean, cambian la expresión de receptores hormonales y proteínas de superficie y comienzan a producir mediadores químicos (factor de crecimiento insulínico de tipo I, PRL, etc.). De esta forma, se facilita la implantación del blastocisto. Además, las arterias del útero se elongan y hay notables cambios en la población de células del sistema inmunitario. En concreto, hay un dramático incremento de células NK (del inglés, *Natural Killer*) específicas de la decidua (uNK, del inglés *uterine NK*), con un fenotipo y función distintos a las células NK circulantes. Las células uNK no tienen actividad citolítica y expresan integrinas que les permiten migrar e invadir la decidua. Estas células uNK controlan el desarrollo de una correcta vascularización para mantener el embarazo y, por otra parte, regulan la capacidad invasiva del trofoblasto (Yoshinaga, 2008). Esta última función de las células uNK es importante porque, en esta etapa, el trofoblasto se comporta como un tumor invasivo ya que, además de una gran capacidad de invasión,

tiene un aspecto poco diferenciado y altamente proliferativo. De hecho, el trofoblasto humano es el más invasivo de todos los conocidos y, gracias a ello, establece la unión más estrecha posible entre la madre y el feto. Pero es necesario que el tejido materno imponga una limitación a esta capacidad invasiva, para que el trofoblasto no sobrepase la primera capa muscular subyacente al endometrio. Otro cambio característico de la decidualización es el desplazamiento del equilibrio de citoquinas (Th1/Th2) hacia las Th2, más relacionadas con la respuesta antiinflamatoria. Aunque tradicionalmente se ha relacionado con un mecanismo específico para evitar el rechazo inmunitario del embrión, Lunghi et al. (2007) han sugerido que se trataría de una inmunomodulación encaminada a regular los procesos vasculares de la placentación.

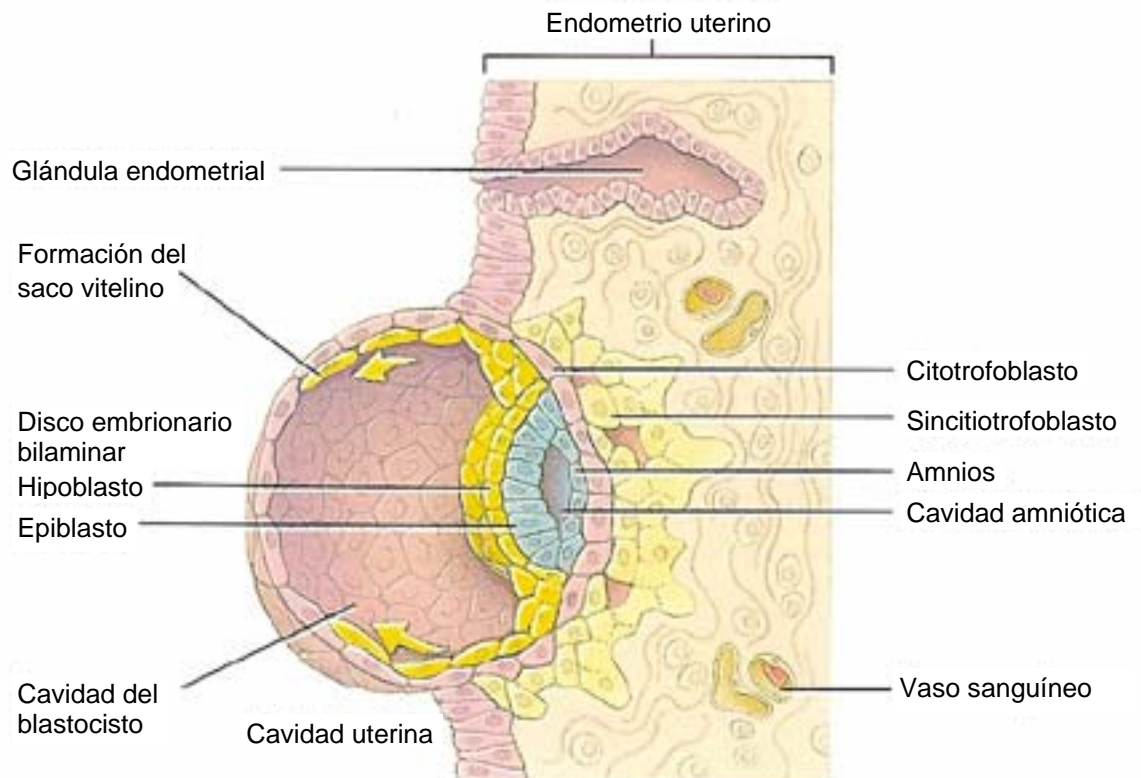
### **II.1.2. Segunda semana del desarrollo**

Unos ocho días después de la fecundación el trofoblasto se diferencia en dos capas: el citotrofoblasto (capa interna) y el sincitiotrofoblasto (capa externa) (Figura 3). Durante la implantación, el sincitiotrofoblasto secreta enzimas que permiten la penetración del blastocisto en el epitelio endometrial. Además, las dos capas del trofoblasto secretan gonadotropina coriónica humana (hCG), una hormona que evita la degeneración del cuerpo lúteo en el ovario con el fin de que secrete progesterona y estrógenos hasta que sea relevado por la placenta. Estas hormonas permiten que el endometrio uterino permanezca en estado secretor y, en consecuencia, inhiben la menstruación.

Paralelamente a los cambios en el trofoblasto, las células de la masa celular interna también se diferencian en dos capas: el hipoblasto (endodermo primitivo) y el epiblasto (ectodermo primitivo) (Figura 3). Las células del hipoblasto y del epiblasto forman un disco plano conocido como disco embrionario bilaminar. Además, se forma una pequeña oquedad dentro del epiblasto que al aumentar de tamaño da lugar a la cavidad amniótica. A medida que la cavidad amniótica se expande, se desarrolla una fina membrana protectora a partir del epiblasto: el amnios. Cuando el embrión crece el amnios lo rodea por completo (Figura 3) y la cavidad se llena de líquido amniótico. Este líquido amortigua los golpes que puede recibir el feto, contribuye a regular la

temperatura corporal, evita la deshidratación e impide la formación de adherencias entre la piel del feto y los tejidos que lo rodean.

Durante el octavo día post-fecundación las células del hipoblasto migran y cubren la superficie interna de la pared del blastocisto, formando la pared del saco vitelino (Figura 3). El saco vitelino cumple varias funciones esenciales: aporta nutrientes al embrión durante la segunda y la tercera semana del desarrollo, proporciona células de la sangre entre la tercera y la sexta semana, contiene las primeras células (células germinales primitivas) que luego migran hacia las gónadas en vías de desarrollo, forma parte del intestino y también contribuye a amortiguar los golpes y a evitar la deshidratación del embrión.



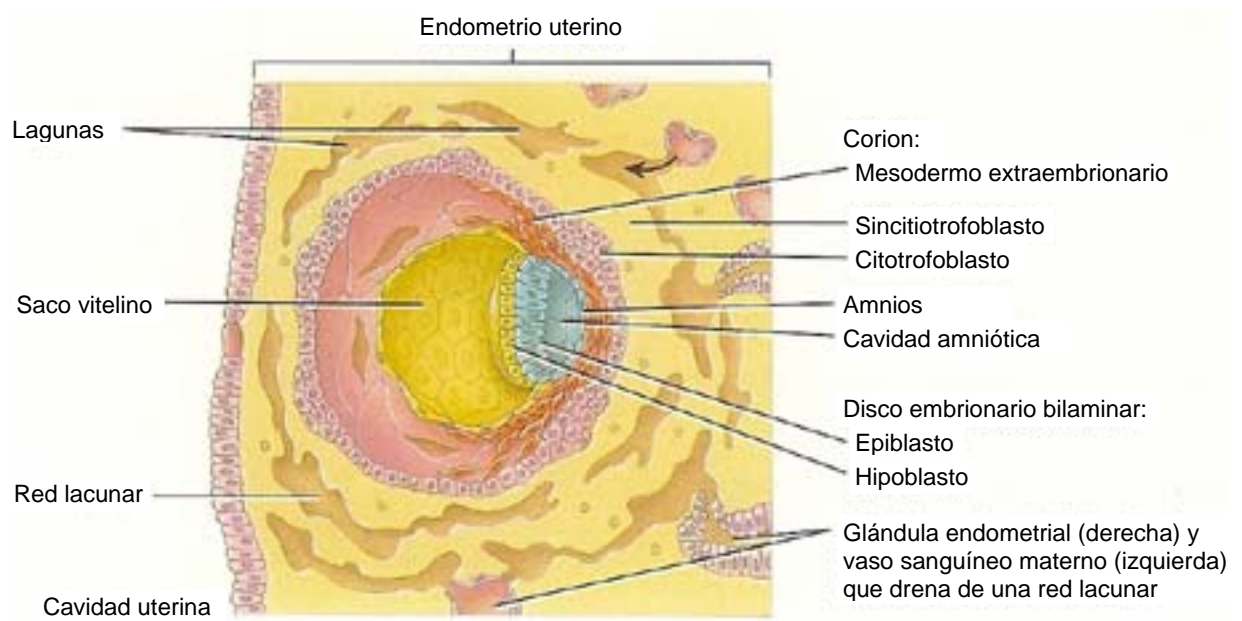
**Fig. 3.** El blastocisto aproximadamente 8 días después de la fecundación.

Fuente: Tortora y Derrickson (2008)

Al noveno día, el blastocisto queda completamente inmerso en el endometrio y aparecen pequeños espacios dentro del sincitiotrofoblasto que reciben el nombre de lagunas (Figura 4). Hacia el decimosegundo día las lagunas se fusionan y forman



espacios interconectados más amplios: las redes lacunares (Figura 4). La sangre materna y las secreciones glandulares entran en las lagunas y redes lacunares, aportan nutrientes y evacúan los desechos embrionarios. En ese mismo día, las células mesodérmicas derivadas del saco vitelino forman un tejido conectivo alrededor del amnios y el saco vitelino que se denomina mesodermo extraembrionario (Figura 4). El mesodermo extraembrionario y las dos capas del trofoblasto forman el corion (Figura 4). El corion rodea al embrión, luego al feto y, por último, se convierte en la principal parte embrionaria de la placenta. Además, protege al embrión y al feto de las respuestas inmunitarias de la madre y también produce hCG. Hacia el final de la segunda semana de desarrollo, el disco embrionario bilaminar está conectado con el trofoblasto a través de una banda de mesodermo extraembrionario, conocido como pedículo embrionario o de fijación, que representa el primer esbozo del futuro cordón umbilical.



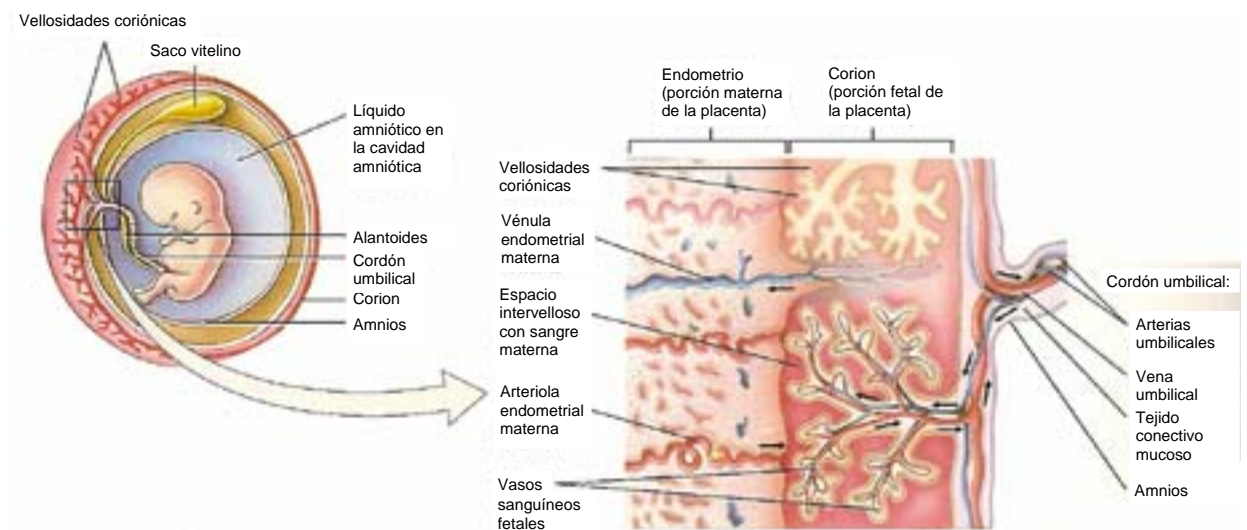
**Fig. 4.** El blastocisto aproximadamente 12 días después de la fecundación.  
Fuente: Tortora y Derrickson (2008)

### II.1.3. Desarrollo de la placenta

La placentación, que se inicia a partir de este momento, está íntimamente ligada al desarrollo vascular y al establecimiento de la circulación feto-placentaria, que son

imprescindibles para satisfacer las crecientes demandas del feto. La placenta es una interfase que funciona como una membrana selectiva para el intercambio de gases, nutrientes y productos de desecho. Es decir, tiene funciones respiratorias, nutritivas y excretoras. Pero, al mismo tiempo, también es una sofisticada unidad endocrina que produce y, a veces, modifica hormonas. Sin embargo, la presencia durante el embarazo de células de origen fetal (como eritrocitos, leucocitos y células del trofoblasto) en la circulación materna cuestiona la afirmación de que la placenta es una barrera perfecta (Guetta et al., 2004; Gilmore et al., 2008).

Al final de la segunda semana se empiezan a desarrollar las vellosidades coriónicas. Se trata de proyecciones digitiformes compuestas por corion y que contienen vasos sanguíneos fetales (Figura 5). Hacia el final de la tercera semana, los capilares sanguíneos que se desarrollan en las vellosidades coriónicas se conectan con el corazón embrionario a través de las arterias y las venas umbilicales. Como consecuencia, los vasos sanguíneos maternos quedan muy cerca de los fetales (Figura 5).



**Fig. 5.** Placenta y cordón umbilical.

Fuente: Tortora y Derrickson (2008)

Por lo que respecta a la parte materna, las arterias uterinas presentes en el endometrio se denominan espirales y tienen la peculiaridad de responder al estímulo hormonal y a factores de crecimiento. Su trayectoria espiral se debe a que el



crecimiento arterial durante el ciclo menstrual y el embarazo sobrepasa el crecimiento en espesor del endometrio. Evidentemente esta curiosa morfología tiene repercusión hemodinámica, puesto que la presión sanguínea disminuye progresivamente a lo largo de su longitud y el pulso se amortigua. De esta forma se mantiene un flujo continuo de sangre hacia el espacio intervelloso de la placenta. Por otra parte, esa longitud extraordinaria facilita que se puedan estirar durante el crecimiento uterino que acompaña el embarazo (Pijnenborg et al., 2006).

Precisamente, la invasión de las arterias espirales uterinas por células procedentes del trofoblasto es uno de los rasgos más característicos de la placentación humana. En esta migración a través de la decidua están implicadas diversas quimoquinas, al igual que en la regulación de la migración de los leucocitos (Hannan et al., 2006). Las células trofoblásticas extravelosas que se asocian a las arterias espirales uterinas inician un proceso de profunda remodelación de las mismas. La transformación más destacable es la destrucción de su pared muscular y la sustitución del recubrimiento endotelial original por células del trofoblasto. Como resultado, las pequeñas arterias uterinas se transforman en vasos distendidos y flácidos recubiertos de material fibrinoide en el que quedan inmersas células trofoblásticas, que vierten abundante sangre materna a los espacios intervellosos. Es decir, se convierten en pequeños canales pasivos para la circulación uterina y así aumenta notablemente el flujo sanguíneo a la placenta. Esta transformación afecta a prácticamente todas las arterias espirales, cuyo número oscila entre 100 y 150 (Lyll, 2005; Pijnenborg et al., 1998).

Hacia la semana 14 la placenta ha alcanzado su forma definitiva, aunque el grado de ramificación de las vellosidades y el espacio intervelloso continuarán aumentando a lo largo del embarazo. Con ello se dispondrá de una mayor superficie tanto para el intercambio entre el feto y la madre como para el anclaje del feto en la pared uterina. En la placenta se distinguen con facilidad dos caras: la materna y la fetal. Por el lado decidual, por el que se une al útero, existen unas 10-35 protuberancias o lóbulos. La superficie fetal, orientada hacia la cavidad amniótica, es más lisa y está cubierta completamente por la placa coriónica en la que se advierten gruesas arterias y vasos que convergen hacia el cordón umbilical. Entre ambas caras se encuentra el espacio

interveloso. La placenta madura es un órgano muy vascularizado, con forma discoidal y un diámetro aproximado de 15 a 20 cm, un espesor de 1,5 a 2,5 cm y un peso medio de 500 g (Schwarze, 1984).

El cotiledón fetal es la unidad funcional básica de la placenta para la transferencia entre la sangre materna y la sangre fetal. Está formado por un tronco vellositario primario con todas sus ramificaciones. Cada cotiledón es independiente desde el punto de vista funcional, aunque no exista una clara separación física entre ellos. De hecho, el espacio interveloso tiene continuidad a lo largo de toda la placenta. Los lóbulos que se aprecian desde la cara materna de la placenta son divisiones anatómicas más que funcionales ya que, en realidad, cada lóbulo contiene varios cotiledones. Estas divisiones se forman por proliferación de la decidua hacia los espacios intervellosos, pero no llegan a la placa coriónica.

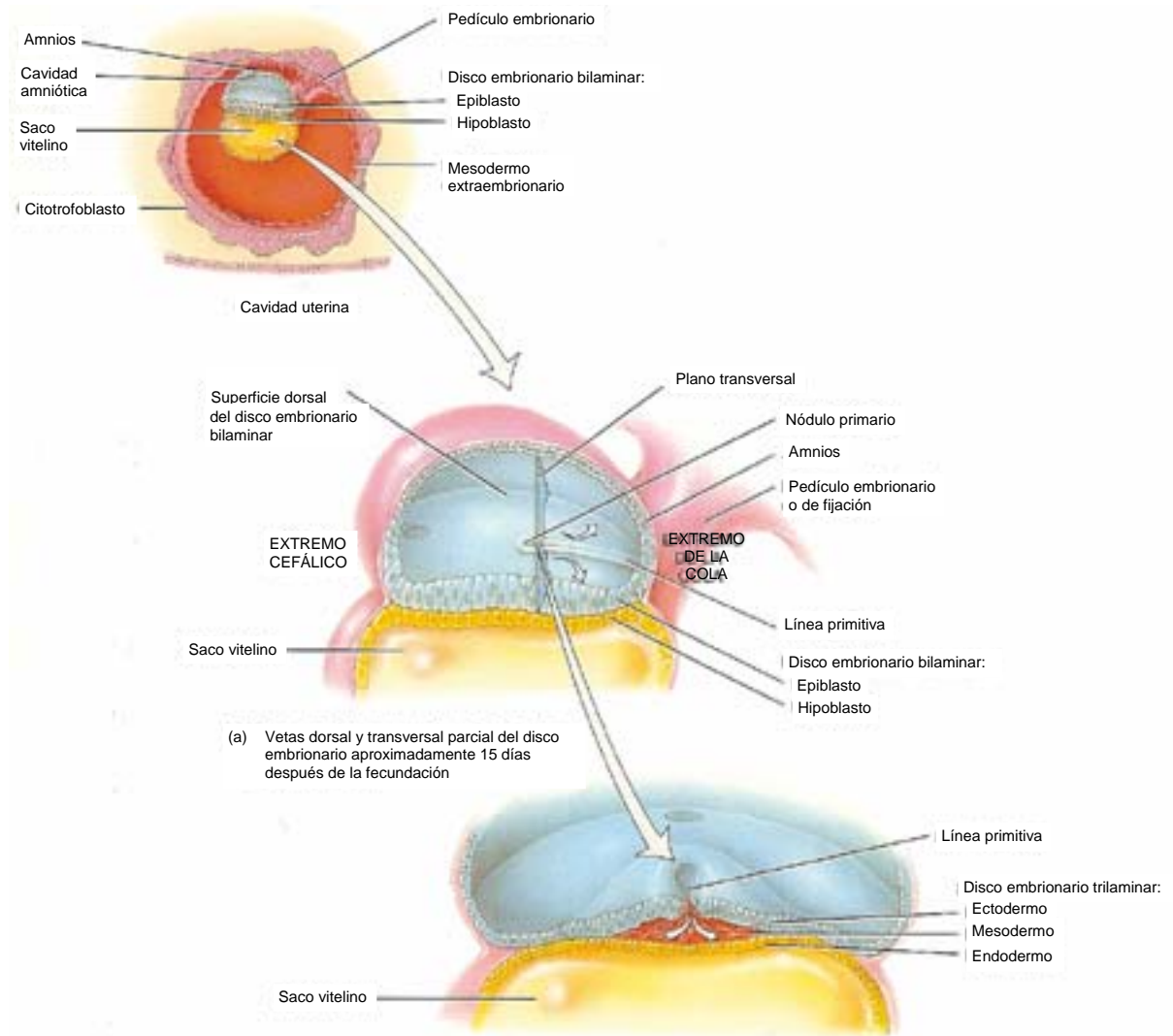
En los primeros momentos, la interfase materno-fetal se caracteriza por ser un sistema muy hipóxico, ya que los trofoblastos bloquean las arterias espirales maternas y no existe flujo sanguíneo a través del espacio interveloso. A diferencia de las arterias, las glándulas del útero materno sí se abren al espacio interveloso, con lo que el trofoblasto tiene acceso a glucógeno y otras sustancias de secreción glandulares para su nutrición (Burton et al., 2002). Más tarde, cuando desaparece el bloqueo, la sangre materna entra en el cotiledón a través de las arterias espirales uterinas hacia el espacio interveloso, en el que están flotando las vellosidades, de manera semejante a como lo hacen las algas en el mar. La sangre que entra es rica en oxígeno y nutrientes, que se intercambian con dióxido de carbono y productos de desecho procedentes de las vellosidades. La sangre empobrecida en oxígeno drena gracias a grandes venas, también dispuestas en la placa basal. En condiciones normales el espacio interveloso de la placenta contiene unos 150 ml de sangre, que se renuevan tres o cuatro veces por minuto (Langman, 1969). El corazón del embrión comienza a latir hacia el día 21, iniciándose entonces la circulación de la sangre fetal hacia los vasos de la placenta. Los vasos sanguíneos formados en el eje de los troncos vellositarios primarios se continúan con los vasos de la placa coriónica y del pedículo de fijación, que dará lugar posteriormente al cordón umbilical. Este sistema vascular extraembrionario, al ponerse

en contacto con los vasos procedentes del embrión, hace posible la comunicación entre las dos circulaciones.

La división entre la circulación fetal y la materna se denomina a menudo barrera placentaria y consta de varias capas: endotelio de los capilares fetales en la vellosidad, una cantidad variable de tejido conectivo y el sincitiotrofoblasto que cubre la vellosidad. Las dos circulaciones se aproximan progresivamente a medida que avanza el embarazo y esos tejidos se adelgazan, pero nunca se mezclan (Figura 5). La circulación fetal siempre está exclusivamente circunscrita a su circuito. En las etapas finales de la gestación, el tejido conectivo prácticamente desaparece y la barrera placentaria consta de tan solo dos capas celulares, que nunca llegan a desaparecer (Mori et al., 2007). Por eso, se denomina placentación hemocorial, indicando que el trofoblasto placentario está en contacto directo con la sangre materna. Este tipo de placentación no es exclusiva de la especie humana sino que también se presenta en todos los primates y los roedores.

#### **II.1.4. Gastrulación**

La tercera semana supone el inicio de un periodo de diferenciación rápida del embrión con el establecimiento de las tres capas germinales primitivas, que constituyen las bases para el desarrollo de los órganos entre la cuarta y la octava semana. El primer evento importante es la gastrulación (Figura 6). Durante este proceso, parte de las células del epiblasto se invaginan, se separan de esta capa y presionan a un grupo de células del hipoblasto. Precisamente, estas células del hipoblasto darán lugar al endodermo. Las células procedentes del epiblasto que se sitúan entre éste y el endodermo recién formado constituirán el mesodermo. Finalmente, las células que permanecen en el epiblasto integrarán el ectodermo. A medida que el embrión se desarrolla, el endodermo se convierte en la cubierta epitelial de la mayor parte del aparato digestivo, las vías respiratorias y otros órganos. El mesodermo dará lugar a los diversos tejidos conectivos, incluyendo el muscular y el óseo. Por su parte, el ectodermo se transformará en la epidermis de la piel y en el sistema nervioso.



**Fig. 6.** Gastrulación.  
Fuente: Tortora y Derrickson (2008)

### II.1.5. Periodo fetal

Durante el periodo fetal, los tejidos y los órganos que surgieron durante el periodo embrionario crecen y se diferencian. En este periodo aparecen muy pocas estructuras nuevas pero la velocidad de crecimiento corporal es notable, particularmente durante la segunda mitad de la vida intrauterina. Así, durante los últimos dos meses y medio, el feto adquiere la mitad del peso que tiene a término. A continuación, se hace un breve resumen de los principales cambios que se producen durante el desarrollo fetal.

Entre las 9 y las 12 semanas (~7,5 cm, ~30 g), la cabeza representa aproximadamente la mitad de la longitud corporal y la longitud fetal casi se duplica con relación a la octava semana. El tamaño del encéfalo sigue en aumento. La cara es ancha, con ojos completamente desarrollados, cerrados y muy separados. Aparece el apéndice nasal. Se desarrollan los oídos internos en una posición baja. La osificación continúa y los miembros superiores casi alcanzan su longitud final relativa mientras que los miembros inferiores no están tan desarrollados. Ya se pueden detectar los latidos cardiacos. El sexo puede distinguirse a través de los genitales externos. El feto excreta su orina en el líquido amniótico. La médula ósea roja, el timo y el bazo participan en la formación de las células sanguíneas. El feto empieza a moverse pero la madre no puede percibir sus movimientos.

Entre las 13 y las 16 semanas (~18 cm, ~100 g), la cabeza es relativamente más pequeña que el resto del cuerpo. Los ojos se desplazan en dirección medial hacia su posición final y los oídos también se movilizan hacia sus posiciones definitivas. Los miembros inferiores se alargan.

Entre las 17 y las 20 semanas (~25-30 cm, ~200-450 g), ya son visibles las cejas y el pelo de la cabeza. El crecimiento es más lento pero los miembros inferiores continúan su elongación. La vérnix caseosa (secreción lipídica de las glándulas sebáceas y células epiteliales muertas) y el lanugo (vello fetal fino) cubren el feto. Se forma la grasa parda, que proporciona calor. La madre suele percibir los movimientos fetales.

Entre las 21 y las 25 semanas (~27-35 cm, ~550-800 g), se produce un aumento significativo del peso y la piel es rosada y está arrugada. Hacia las 24 semanas, las células pulmonares empiezan a producir agente tensioactivo.

Entre las 26 y las 29 semanas (~32-42 cm, ~1.100-1.350 g), los ojos están abiertos. La grasa corporal representa el 3,5% de la masa corporal total. Los testículos empiezan a descender hacia el escroto entre las 28 y las 32 semanas. La médula ósea roja es el principal lugar donde se producen las células sanguíneas. Muchos fetos que nacen prematuramente durante este periodo sobreviven porque los pulmones pueden

proporcionar ventilación y el sistema nervioso central ha alcanzado un desarrollo suficiente para controlar la respiración y la temperatura corporal.

Entre las 30 y las 34 semanas (~41-45 cm, ~2.000-2.300 g), la piel es rosada y lisa. El feto se coloca con la cabeza hacia abajo. El reflejo pupilar aparece hacia las 30 semanas. La grasa corporal representa el 8% de la masa corporal total.

Entre las 35 y las 38 semanas (~50 cm, ~3.200-3.400 g), la piel suele ser de color rosa-azulado y la velocidad de crecimiento disminuye a medida que se aproxima el parto. La grasa corporal representa el 16% de la masa corporal total. Incluso después del parto, el niño no está desarrollado por completo y se necesitará un año más para el desarrollo completo del sistema nervioso.

#### **II.1.6. Compatibilidad materno-fetal**

Desde el punto de vista inmunológico, el embarazo supone un problema porque la placenta y el feto son genéticamente distintos a la madre, pudiendo considerarse como un “injerto”. Afortunadamente, la madre no suele desarrollar reacciones inflamatorias ni rechazo inmunitario frente a los tejidos embrionarios. Esto se debe a que las células deciduales rodean estrechamente al blastocisto después de la implantación creando una barrera física frente a los linfocitos que normalmente median en las reacciones de rechazo. Además, el sincitiotrofoblasto y las células trofoblásticas extravelosas, que son las que llegan a contactar con células maternas, tienen un estado de privilegio inmunitario. Este estado se explica por la ausencia de expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I (HLA-A y HLA-B) (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigen*), que se expresan en todas las células corporales y son responsables de distinguir lo “propio” de lo “ajeno”, y de clase II (HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP), que intervienen en el rechazo a los aloinjertos.

Esos tejidos fetales expresan exclusivamente antígenos HLA-G, que es un mediador de la tolerancia que impide la acción de las células uNK, y una pequeña cantidad de HLA-C, que no intervienen en la respuesta inmunitaria específica.

Además, se sintetizan anticuerpos “facilitantes”, capaces de bloquear los antígenos maternos presentes en el feto. En definitiva, en el útero el feto está inmunológicamente camuflado y protegido de los mecanismos citotóxicos maternos.

### **II.1.7. Parto**

El trabajo del parto es el proceso mediante el cual el feto sale del útero a través de la vagina (Vontver, 2007). Durante el embarazo la progesterona inhibe las concentraciones uterinas pero, cuando se acerca el final, se produce un notable aumento en la concentración sanguínea de estrógenos y su acción supera los efectos inhibidores de la progesterona. Los estrógenos también estimulan la secreción de prostaglandinas en la placenta que, a su vez, inducen la producción de enzimas que digieren fibras de colágeno en el cuello uterino, lo que conduce a su reblandecimiento. Las elevadas concentraciones de estrógenos estimulan a las fibras musculares uterinas para que expongan receptores de oxitocina, que es la hormona que promueve las contracciones uterinas. Por su parte, la relaxina contribuye mediante el aumento de la flexibilidad de la sínfisis del pubis y la dilatación del cuello uterino.

El control de las contracciones asociadas con el trabajo de parto depende de un ciclo de retroalimentación positiva. Las contracciones uterinas impulsan la cabeza del feto hacia el cuello uterino, que se estira. Este hecho estimula una serie de receptores en el cuello uterino que envía impulsos nerviosos hacia el hipotálamo para que libere oxitocina. Esta hormona desencadena contracciones uterinas más intensas que estiran aún más el cuello uterino y que, a su vez, estimulan la secreción de más oxitocina. Este sistema de retroalimentación finaliza tras el parto ya que empieza a disminuir el estiramiento del cuello uterino.

Las contracciones uterinas se producen en forma de ondas (de forma similar a las ondas peristálticas) que se inician en la parte superior del útero y se desplazan en sentido distal con el fin de expulsar el feto. El trabajo de parto verdadero se inicia cuando las contracciones uterinas son regulares y, en general, dolorosas. El indicador más fiable del inicio del parto es la dilatación del cuello uterino y la expulsión de una

secreción característica de moco sanguinolento (el tapón mucoso). En general, el trabajo de parto se puede dividir en tres fases:

(1) Fase de dilatación: Es el periodo comprendido entre el comienzo del trabajo del parto y la dilatación completa (hasta 10 cm) del cuello uterino. Esta fase dura entre 6 y 12 horas y se caracteriza por contracciones uterinas regulares y rotura del saco amniótico (si no se produce espontáneamente debe hacerse de forma artificial).

(2) Fase de expulsión: Es el periodo desde la dilatación completa del cuello uterino hasta el nacimiento del neonato y puede durar entre unos pocos minutos y varias horas.

(3) Fase placentaria: Es el periodo entre el parto y la expulsión (“alumbramiento”) de la placenta mediante contracciones uterinas intensas y suele durar entre 5 y 30 minutos. Tales contracciones producen la constricción de los vasos sanguíneos que se rompieron durante el parto y, de esta manera, reducen la probabilidad de hemorragia.

Tras la expulsión del bebé y la placenta, se inicia un período de aproximadamente seis semanas en el que los órganos y la fisiología reproductora materna recuperan el estado anterior al embarazo. Este periodo se conoce como puerperio.

La distocia, o trabajo de parto complicado, puede deberse a una presentación (posición) anómala del feto o a un tamaño inadecuado del canal del parto para permitir la salida fisiológica del feto por vía vaginal. Si la aparición de sufrimiento fetal o materno impide la realización de un parto por dicha vía, el bebé puede nacer mediante cesárea o, lo que es lo mismo, a través de una incisión quirúrgica del abdomen por donde se extrae al niño y a la placenta.



## **II.2. CAMBIOS FISIOLÓGICOS DURANTE EL EMBARAZO**

Durante el embarazo se producen numerosos cambios anatómicos y fisiológicos transitorios en la mujer cuyo fin es conseguir un marco idóneo para el desarrollo del feto. Estos cambios, que se inician en la fecundación y culminan en el parto, afectan a prácticamente todos los sistemas, incluyendo el cardiovascular, el respiratorio, el genitourinario, el digestivo y las glándulas mamarias (González-Merlo, 2006). La mayoría de estos cambios están regulados hormonalmente. En esta acción hormonal, además de la madre, también intervienen la placenta y el feto, que desde épocas sorprendentemente precoces ejercen una actividad endocrina muy definida (Botella-Llusiá, 2008).

Existen hormonas específicas de la gestación, como la hCG y el lactógeno placentario humano (LPH). Desde el comienzo de la implantación, el trofoblasto sintetiza hCG que, como ya se ha indicado, es indispensable para el mantenimiento del embarazo, estimulando la producción de estrógenos y progesterona por parte del cuerpo lúteo. A partir de la décima semana de gestación, es la placenta la responsable de la secreción de estos esteroides sexuales. El LPH aumenta la lipólisis y la resistencia a la insulina y, por tanto, la concentración de ácidos grasos libres, insulina y glucosa en sangre. De esta forma se asegura un aporte adecuado de energía tanto para la madre como para el feto. El LPH fomenta el flujo placentario de aminoácidos, restringiendo la utilización materna de las proteínas (González-Merlo, 2006).

Por otra parte, se intensifica la secreción de ciertas hormonas que ya se producían antes del embarazo, como corticosteroides e insulina, además de los estrógenos y progestágenos ya indicados. Precisamente, el notable incremento en la producción de progesterona y estrógenos es el cambio hormonal más significativo del embarazo. La progesterona, considerada como la “hormona del embarazo”, tiene un efecto relajante sobre la musculatura lisa uterina y disminuye la respuesta inmunitaria materna para evitar el rechazo del “aloinjerto” fetal (Yoshinaga, 2008). Los estrógenos influyen en el crecimiento del útero e incrementan su flujo sanguíneo, estimulan el crecimiento de los conductos mamarios y, junto a la progesterona, inducen el desarrollo de la glándula mamaria e inhiben la secreción láctea durante la gestación.

Los estrógenos y la progesterona influyen en otros muchos cambios que se producen en la mujer embarazada, que se tratan en los apartados siguientes, y están relacionados con el comienzo del parto (Mesiano y Welsh, 2007).

La placenta produce otras hormonas y proteínas que actúan fundamentalmente como moléculas transportadoras de esteroides y pueden ejercer funciones hormonales o enzimáticas, además de tener un posible papel inmunitario e intervenir en la regulación metabólica.

### **II.2.1. Cambios generales**

Hacia el final del tercer mes del embarazo, el útero ocupa la mayor parte de la cavidad pelviana. A medida que el feto va creciendo, el útero se expande hacia una posición más elevada en la cavidad abdominal. Hacia el final de la gestación ocupa casi toda la cavidad abdominal y llega casi hasta el apéndice xifoides del esternón. El útero desplaza al estómago, al hígado y al intestino hacia arriba, eleva el diafragma y ensancha la cavidad torácica.

El sistema cardiocirculatorio comienza a cambiar ya desde los primeros días, observándose una vasodilatación generalizada y un aumento de la proliferación vascular. Esto se acompaña de un incremento del volumen sanguíneo, que se inicia entre las semanas 8 y 12 de gestación y alcanza su máximo en las semanas 34-36. Más concretamente, el volumen sistólico aumenta un 30% y el volumen cardíaco se eleva entre un 20 y un 30%. De esta manera se facilita el intercambio de gases, nutrientes y metabolitos entre la madre y el feto y se compensarán las pérdidas de sangre que tendrán lugar durante el parto.

El aumento del volumen sanguíneo se debe a la acción hormonal (progesterona, prostaciclina, óxido nítrico) que disminuye el tono vascular y, como consecuencia, la resistencia vascular. Sin embargo, se observa un efecto de hemodilución (anemia fisiológica) porque el incremento del volumen plasmático sólo se acompaña de un ligero aumento (20%) en la fracción celular. La concentración en la sangre de los factores de coagulación es mayor (estado hipercoagulable), al igual que la de los

leucocitos hacia el final del embarazo. El volumen sistólico aumenta un 30% y el volumen cardíaco se eleva entre un 20 y un 30%. La frecuencia cardíaca aumenta entre un 30 y un 50%, sobre todo durante la segunda mitad del embarazo. Estos aumentos son necesarios para cubrir las mayores demandas de nutrientes y oxígeno para el feto.

La función pulmonar también se compromete a partir de la semana 8-9 para adaptarse al aumento de la demanda de oxígeno del feto. El volumen corriente aumenta entre un 30 y un 40% mientras que el de reserva respiratorio puede disminuir hasta un 40%, la ventilación por minuto (volumen total de aire inhalado y exhalado por minuto) puede incrementarse hasta un 40% y el consumo corporal total de oxígeno puede aumentar entre un 10 y un 20%. En general, estos cambios se deben al efecto de la progesterona, que relaja las fibras musculares lisas bronquiales, disminuyendo la resistencia de las vías respiratorias. Esto satisface la mayor demanda de O<sub>2</sub> y evita una excesiva exposición del feto a niveles elevados de CO<sub>2</sub>. El volumen del perímetro torácico suele aumentar unos 5-7 cm. Ocasionalmente, la mujer puede presentar disnea a medida que el útero empuja al diafragma.

Entre los cambios anatómicos que afectan al aparato urinario cabe citar un ligero aumento del riñón en peso y tamaño (1-1,5 cm) y, en especial, la dilatación del sistema colector (cálices, pelvis renal y uréteres). La acción hormonal y los ajustes cardiovasculares previamente indicados tienen reflejo en la función renal: aumenta el flujo plasmático renal (del 50 al 80%) y el índice de filtración glomerular, que puede llegar a ser superior al 50% del que tenía la mujer antes del embarazo. En consecuencia, disminuye la concentración de urea, creatinina y ácido úrico en sangre. La saturación del sistema de transporte tubular de la glucosa favorece una ligera glucosuria. De igual manera, hay una mayor excreción de otras sustancias como vitaminas hidrosolubles, aminoácidos e incluso proteínas. La disminución de la resistencia vascular sistémica pone en marcha el sistema renina-angiotensina. La angiotensina II es una hormona vasoconstrictora que estimula la liberación de aldosterona por parte de la corteza renal provocando que la reabsorción de sodio y agua en los túbulos renales sea mayor y que aumente el agua plasmática y extracelular. La presión del útero sobre la vejiga puede ocasionar síntomas urinarios como

polaquíuria (aumento de la frecuencia miccional), urgencia miccional e incontinencia de esfuerzo.

En cuanto al aparato genital, se produce edema y aumento de flujo sanguíneo hacia la vagina. El útero aumenta su masa desde 60-80 g antes del embarazo hasta entre 900 y 1.200 g a término. Este hecho se debe a los cambios endometriales, al aumento de la cantidad de fibras musculares en el miometrio al principio del embarazo y al alargamiento de las mismas durante el segundo y tercer trimestre.

Por otra parte, se observa una hiperpigmentación (con una intensidad variable dependiendo de la mujer) en la línea alba abdominal, vulva, areola y pezones, debido a que la progesterona favorece el incremento de la hormona hipofisaria estimulante de los melanocitos. A medida que el útero se agranda pueden aparecer estrías sobre la piel del abdomen y se pierde vello.

Obviamente, el peso de la mujer embarazada aumenta (entre 10 y 12 kg) como consecuencia del incremento en el peso del útero y su contenido (feto, líquido amniótico y placenta), así como de la volemia y del líquido extravascular.

### **II.2.2. Cambios en el aparato digestivo**

La acción hormonal induce modificaciones y alteraciones bucales como sialorrea fisiológica e inflamación de las encías. Además cambia la composición de la saliva y, en consecuencia, el pH oral y la microbiota bacteriana, acrecentándose la susceptibilidad a las caries, principalmente en aquellas mujeres propensas o con focos iniciales (Mariotti, 1999).

El efecto predominante de la gestación sobre el sistema gastrointestinal está vinculado, por un lado, al desplazamiento de los órganos contenidos en la cavidad abdominal por el crecimiento progresivo del útero. El estómago se desplaza hacia arriba, se modifica su contorno y aumenta la presión intraluminal. Todo ello favorece la apertura del cardias y permite el reflujo de secreciones ácidas hacia la parte inferior del esófago. En las primeras semanas del embarazo, la producción de jugo gástrico

está disminuida, reflejándose en un pH gástrico más básico. La progesterona relaja la musculatura lisa del aparato digestivo, por lo que el tránsito gástrico e intestinal se encuentra enlentecido sobre todo en el tercer trimestre. La reducción general de la motilidad del tubo digestivo, junto con el aumento de la presión que ejerce el útero, puede provocar problemas de estreñimiento, hemorroides, retraso del vaciado gástrico, náuseas, vómitos, reflujo esofágico y/o pirosis. Estos dos factores son clave para un proceso fundamental para la colonización del intestino fetal y de la glándula mamaria: la translocación masiva de bacterias intestinales en las últimas semanas antes del parto.

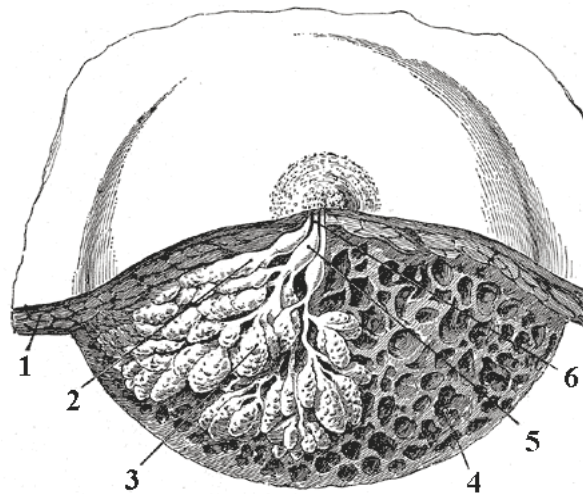
La acción de la progesterona se manifiesta también en la vesícula biliar, que aparece atónica, distendida y con un vaciado lento, y en la bilis, cuya viscosidad aumenta. Por este motivo la aparición de cálculos vesiculares y cuadros clínicos de colestasis intrahepática es más frecuente durante la gestación. El hígado no sufre cambios morfológicos ni fisiológicos significativos. La secreción y la absorción gastrointestinal tampoco se ven afectadas (Baron et al., 1993).

### **II. 2.3. Cambios en la glándula mamaria**

El atributo más definitorio de la Clase Mamíferos es la capacidad de las madres de producir leche para sus crías. Los grandes cambios fisiológicos y morfológicos que se producen en las glándulas mamarias durante el embarazo y la lactancia requieren una compleja coordinación entre muchos sistemas (Hammond, 1997). De hecho, las glándulas mamarias alcanzan su completo desarrollo durante la lactancia.

En la mujer adulta, el tejido glandular en la mama está formado por un sistema de alvéolos y numerosos conductos ramificados inmersos en un estroma de soporte (tejido adiposo y tejido conjuntivo fibroso). Tradicionalmente se ha descrito que este tejido glandular consta de 15 a 20 lóbulos dispuestos de forma radial hacia el pezón (Figura 7). Cada lóbulo se divide en 20 o 40 lobulillos que, a su vez, contienen entre 10 y 100 alveolos o acinos. Estos alveolos constituyen las unidades secretoras que drenan en pequeños conductos, los cuales se unen para formar conductos mayores que, finalmente, desembocan en un conducto lactífero. Es decir, cada lóbulo termina en un solo conducto lactífero, que recoge todas las secreciones para dirigirlas al pezón. A la

altura de la base del pezón, los conductos suelen presentar una dilatación denominada seno lactífero. Algunos conductos lactíferos se unen poco antes de desembocar en el vértice del pezón por los poros lactíferos (entre 8 y 15).

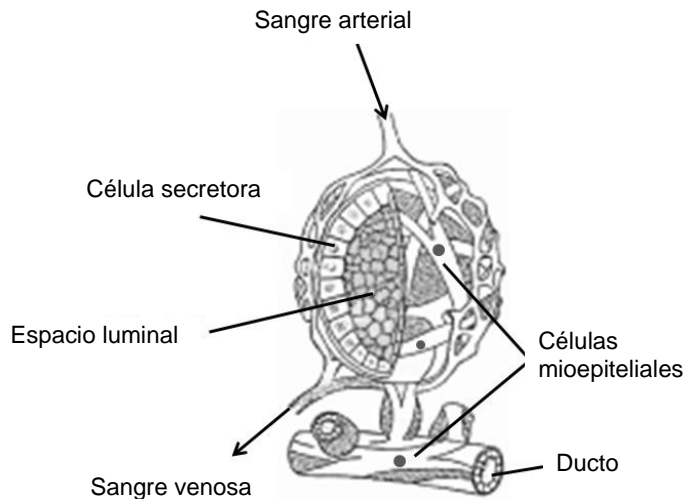


**Fig. 7.** Disección de la mitad inferior de una mama durante el período de lactancia. (1) Tejido adiposo, (2) ducto, (3) lóbulo, (4) tejido conjuntivo, (5) seno lactífero, (6) conducto lactífero.

Fuente: Gray (1918)

Los alveolos y los conductos están tapizados por dos capas de células: una capa continua, interna o luminal de células epiteliales prismáticas con capacidad para secretar leche completa y una capa discontinua basal de células mioepiteliales contráctiles que envuelve a la anterior como si fuera una malla (Figura 8).

Los cambios hormonales asociados al ciclo menstrual contribuyen al desarrollo progresivo de la glándula mamaria. Los estrógenos estimulan la elongación y ramificación de los conductos, mientras que la progesterona favorece la dilatación de los mismos. Estos cambios no revierten completamente al finalizar el ciclo menstrual, por lo que el desarrollo de la glándula mamaria no cesa hasta aproximadamente los 35 años (Geddes, 2007).



**Fig. 8.** Representación esquemática de un alveolo mamario  
Fuente: [www.ugrj.org.mx](http://www.ugrj.org.mx) /Instituto Babcock

Durante el embarazo hay una remodelación masiva de la glándula mamaria encaminada al desarrollo de un órgano exocrino eficiente y altamente especializado. Esta transformación también está regulada hormonalmente e implica cambios estructurales y funcionales.

En primer lugar, durante la primera mitad del embarazo hay una marcada proliferación de células epiteliales, tanto en los conductos como en los alveolos, un intenso crecimiento en número y tamaño de los lóbulos y los acinos y una disminución del tejido adiposo. A estos cambios contribuyen los estrógenos, que estimulan la proliferación epitelial, y la progesterona, que favorece la ramificación de los conductos y la expansión de los lóbulos en forma de racimos.

Al final del primer trimestre el flujo sanguíneo se ha duplicado por la dilatación de los vasos sanguíneos y la formación de nuevos capilares alrededor de los lobulillos. Este mayor flujo sanguíneo proporciona la gran cantidad de nutrientes necesarios para producir la leche. Al mismo tiempo, aumenta la infiltración de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en el tejido intersticial. En las células epiteliales luminales se observa una cierta vacuolización debida a la acumulación de lípidos. Estos cambios provocan un marcado aumento del tamaño de las mamas, apreciable incluso desde la semana 5, que se acompaña de una pigmentación más intensa de la areola y pezón.

La segunda mitad del embarazo se caracteriza por la diferenciación de las células alveolares epiteliales que inician su actividad secretora, denominada lactogénesis I (Cregan y Hartman, 1999). La PRL es la hormona más estrechamente implicada en los cambios genéticos conducentes a la producción de leche, bien directamente o a través de diversos factores de transcripción. En concreto hay mayor concentración de mRNA de muchas proteínas de la leche y de enzimas biosintéticas, así como una acumulación de gotas de lípidos (Neville y Morton, 2001). Las células epiteliales alveolares tienen capacidad, aunque limitada, para secretar algunos componentes de la leche, como lactosa y lactoalbúmina, que se reabsorben y pasan a la sangre. La lactosa se elimina por la orina, pudiéndose emplear este hecho como indicador de que se ha iniciado la lactogénesis I. Otros componentes de la leche, como por ejemplo las caseínas, no se pueden detectar en el producto secretado por las células epiteliales alveolares en esta etapa (McManaman y Neville, 2003).

Al final del embarazo las zonas de oclusión (TJ, del inglés *tight junctions*) entre las células luminales de los alveolos se cierran y se preparan para la secreción activa de calostro (ver apartado II.3.2). La producción de grandes volúmenes de leche está inhibida por la progesterona hasta después del parto (Lawrence y Lawrence, 2005).

## **II.3. LACTANCIA**

### **II.3.1. Fisiología de la lactancia**

La producción de una copiosa cantidad de leche (lactogénesis II) está gobernada por la acción de diferentes hormonas y normalmente se inicia unas horas después del parto. El comienzo de la producción de leche no depende de la succión del lactante, sino de la disminución de la concentración de progesterona asociada a la desaparición de la placenta (que se conoce como “interruptor lactogénico”) (Neville et al., 1991). De hecho, pequeños restos placentarios, retenidos tras el parto, pueden retrasar el inicio de la producción de leche (Neifert et al., 1981). Después del parto, la desaparición del LPH y la disminución de la concentración de progesterona permiten



que la PRL, que se encuentra en altas concentraciones en sangre, se una a sus receptores en la glándula mamaria (Neville et al., 2002).

Los receptores específicos para la progesterona van desapareciendo de las células secretoras a medida que desaparece esta hormona y se inicia la actividad secretora. De esta manera, una vez que se ha establecido la lactancia, la progesterona ya no es capaz de inhibir la acción de la PRL (Fuchs, 1986). Esta última hormona y la oxitocina son los principales agentes que regulan la secreción de leche mediante un mecanismo neurohormonal, que controla tanto la velocidad de síntesis y secreción de la leche como su eyección.

#### II.3.1.1. Prolactina

Es la hormona más importante de la lactancia no sólo durante el desarrollo de la glándula mamaria sino también por su papel en la lactogénesis. Su concentración aumenta progresivamente durante el embarazo hasta unas horas antes del parto, cuando hay una breve caída, incrementándose de nuevo unas 3-4 horas después del nacimiento, en cuanto comienza la succión del pezón. La secreción fisiológica de esta hormona está regulada por el hipotálamo (González-Merlo, 2006). La secreción basal de PRL tiene un ritmo circadiano, con un incremento nocturno que depende del sueño, pero también se libera en forma de pulsos, variables en número y duración, a lo largo del día. Además, la succión determina un aumento de la hormona para que estimule la síntesis de más leche para la siguiente toma.

La PRL fomenta la síntesis de proteínas, lactosa y el metabolismo lipídico; es decir, regula la síntesis de los componentes mayoritarios de la leche por parte de las células epiteliales (Bole-Feysot et al., 1998; Lawrence y Lawrence, 2005). En general, la unión de la PRL a sus receptores incrementa el rRNA y la acumulación de mRNA, lo que se traduce en una elevada expresión génica. Quizá el aspecto más significativo de la lactogénesis II sea el inicio de la síntesis de  $\alpha$ -lactoalbúmina, responsable de la síntesis de lactosa. Este azúcar es muy activo osmóticamente y atrae una gran cantidad de agua hacia el aparato de Golgi, donde se localizan las enzimas necesarias para su síntesis, y las vesículas secretoras que contienen además de lactosa y agua, proteínas y

sales. Esto permite la secreción de grandes cantidades de leche, rasgo característico de la lactogénesis II. Por otra parte, también se observa un marcado incremento de la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y colesterol junto con una disminución de los encargados de degradar los ácidos grasos (Anderson et al., 2007).

El contenido de PRL es mayor en la leche de transición, que es la que se produce justo después del calostro en la primera semana posparto. La PRL presente en la leche es absorbida por el recién nacido e influye en la diferenciación y maduración de, al menos, tres de sus grandes sistemas: el neuroendocrino, el reproductivo y el inmunitario (Ellis et al., 1996).

La leche producida en los alveolos por acción de la PRL no fluye espontáneamente hacia los conductos ni puede llegar al pezón. Para que la leche salga de los alveolos es necesario que sean exprimidos por las células mioepiteliales que los rodean. Esta contracción, o reflejo eyectolácteo, se debe a la liberación de oxitocina.

#### II.3.1.2. Oxitocina

La oxitocina es una hormona sintetizada por neuronas del hipotálamo. Cuando se estimula el pezón, por succión, manipulación e incluso estímulos visuales, sonoros o emocionales relacionados con el bebé, se libera oxitocina al torrente sanguíneo desde donde llega a la glándula mamaria lactante. Allí, la oxitocina interacciona con receptores específicos que se encuentran en las células mioepiteliales, dispuestas alrededor de los alveolos y a lo largo de los conductos, y se inicia la contracción. El resultado es que la leche sale desde los alveolos hacia los conductos y los senos galactóforos (Neville et al., 2002; Martín-Calama, 2004). Éste es el efecto que se conoce como “subida” de la leche.

#### II.3.1.3. Factor inhibidor de la lactancia (FIL)

El volumen homeostático en un espacio cerrado y lleno, como el alveolo mamario, es un problema fisiológico (Stull et al., 2007). En la glándula mamaria, esta

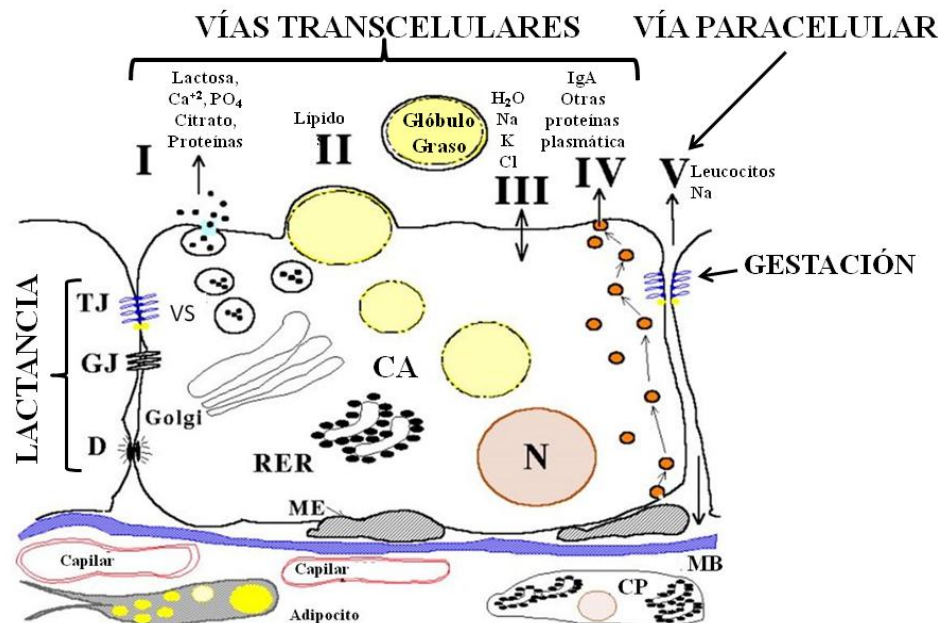
homeostasis se consigue mediante una compleja interacción entre señales: las que viajan a través de vías neuroendocrinas y las autocrinas que afectan a la expresión de los genes implicados en la síntesis de los diversos componentes de la leche. Este sistema autorregulador fue estudiado por Wilde et al. (1995), quienes le denominaron FIL (siglas de *Feedback Inhibitor of Lactation* o retroinhibidor de la lactancia). Entonces lo describieron como una proteína sintetizada por las células epiteliales secretoras de la glándula mamaria que se activaba a medida que la leche se acumulaba en el alveolo, disminuyendo la velocidad de producción de leche. Los estudios *in vitro* demuestran que el FIL disminuye la cantidad de PRL que entra en las células epiteliales secretoras de la glándula mamaria, inhibe la síntesis de proteínas en dichas células e interrumpe la secreción de las vesículas asociadas al aparato de Golgi (Rennison et al., 1993; Wilde et al., 1998).

Estudios más recientes describen que cuando el alveolo está lleno de leche, la glándula mamaria, estimulada y regulada por la PRL, expresa genes esenciales para la biosíntesis de la serotonina (Hernández et al., 2008; Matsuda et al., 2004; Stull et al., 2007). Este neurotransmisor se acumula en el fluido intersticial que rodea el epitelio secretor de la glándula mamaria. Al unirse a sus receptores específicos, inhibe la síntesis de lactosa y proteínas de la leche, la formación de glóbulos de grasa y la secreción de fluidos y solutos. La inhibición de la secreción de leche por la serotonina se debe a la actuación sobre las TJ entre las células epiteliales secretoras, que disipan los gradientes transepiteliales necesarios para la secreción de dicho fluido (Stull et al., 2007). Es decir, tiene un importante papel en el desarrollo y control homeostático de la lactación, así como en la involución de los alveolos mamarios cuando se produce el destete.

#### II. 3.1.4. Mecanismos celulares para la síntesis y la secreción de la leche

Como ya se ha mencionado, la leche se produce y almacena en los alveolos de la glándula mamaria. El citoplasma de las células epiteliales que tapizan los alveolos es característico de las células secretoras activas, ya que tiene numerosas mitocondrias y abundantes vesículas secretoras, y el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi están muy desarrollados (Figura 9). La membrana basal está en contacto con

células mioepiteliales, tejido conjuntivo y el sistema vascular. Además, en el estroma también se encuentran linfocitos B (convertidos en células plasmáticas) que producen IgA que se incorporarán a la leche. En resumen, la glándula mamaria puede considerarse como la integración de la actividad de diversas células y tejidos que van a contribuir de una forma coordinada a la síntesis de la leche.



**Fig. 9.** Estructura de una célula alveolar de glándula mamaria lactante. CA, célula alveolar; N, núcleo; TJ, zona de oclusión; GJ, unión en hendidura (del inglés *gap junction*); D, desmosoma; VS, vesícula secretora; CP, célula plasmática; MB, membrana basal; ME, célula mioepitelial cortada transversalmente; RER, retículo endoplasmático rugoso. Los números romanos señalan las principales vías secretoras: I, exocitosis; II, lípidos; III, transporte apical; IV, transcitosis; y V, vía paracelular.

Fuente: Neville, (1993)

Los constituyentes de la leche sintetizados en las células epiteliales pasan al lumen del alveolo mediante distintas vías secretoras que, dependiendo de cada constituyente y como se ha representado en la Figura 9, pueden ser de tipo transcelular (I, II, III y IV) o paracelular (V) (McManaman y Neville, 2003). La mayoría de los componentes de la fase acuosa de la leche se secretan por exocitosis (I). Las proteínas sintetizadas por los ribosomas pasan al interior del retículo endoplasmático rugoso, donde se pliegan. A continuación, son transportadas al aparato de Golgi que lleva a

cabo las modificaciones postraduccionales adecuadas antes de empaquetarlas en vesículas secretoras. El aparato de Golgi también sintetiza lactosa a partir de los precursores obtenidos del citoplasma. La membrana del aparato de Golgi es impermeable a la lactosa y, como es osmóticamente activa, sus vesículas se llenan de agua. En estas vesículas también se encuentran oligosacáridos, glucosa, nucleótidos, fosfato, calcio y citrato. Al fusionarse las vesículas secretoras con la membrana plasmática apical se libera su contenido en el espacio luminal (Figura 9).

Los lípidos, principalmente triacilglicéridos y fosfolípidos, se secretan mediante una vía transcelular única de las células epiteliales de la glándula mamaria (II) (Figura 9). Los triacilglicéridos se sintetizan en el retículo endoplasmático liso, a partir de ácidos grasos y glicerol, formando unas gotas que se desplazan hacia la membrana apical de la célula. Allí quedan envueltas totalmente por la membrana celular, separándose de la célula. A esta estructura se le denomina glóbulo de grasa. La porción de membrana celular que queda asociada al glóbulo de grasa suministra los fosfolípidos y el colesterol necesarios para el recién nacido. Además, la membrana celular impide la coalescencia con otras gotas, evitando que se formen glóbulos de grasa de gran tamaño, lo que dificultaría su movimiento a través de los conductos. Los glóbulos de grasa contienen, además, numerosos componentes intracelulares entre los que pueden mencionarse enzimas como oxidasas, reductasas e hidrolasas con actividades específicas.

Un reducido número de pequeñas moléculas (glucosa, aminoácidos) e iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) llegan a la leche procedentes de la sangre mediante transportadores específicos de membrana situados en las zonas basal y apical de la célula (III) (Figura 9). Mediante la vía denominada transcitosis (IV), se liberan al espacio luminal moléculas extra-alveolares como Igs, hormonas y factores de crecimiento, tras ser captados en la membrana basal y cruzar el epitelio mamario en forma de endosomas (Figura 9). Las IgA producidas por las células plasmáticas del estroma se unen a receptores específicos en la membrana basal de la célula epitelial. El complejo queda englobado por endocitosis en una vesícula que se dirige hacia la membrana apical donde se funde con ella. La porción extracelular del receptor se hidroliza y queda

unido a la molécula de IgA, denominándose al conjunto IgA secretora (sIgA) (McGhee y Kiyono, 1999; Newburg, 2005; Newburg y Walker, 2007).

Además de todas estas vías activas existentes durante la lactancia, durante el embarazo funciona una quinta vía secretora, la paracelular (V), que permite el paso hacia el alveolo de sustancias plasmáticas, como iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  e incluso leucocitos, en grandes cantidades. El paso no se hace a través de las células epiteliales, sino por los espacios intersticiales, dado que las TJ están abiertas. Ésta es la razón por la cual tanto la secreción elaborada durante el embarazo como el calostro inicial tienen una elevada concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Neville y Morton, 2001). Tras el parto, las TJ entre las células epiteliales se cierran, agotándose esta vía paracelular. Esto se refleja en la disminución de la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la leche madura. Si hay mastitis, las TJ se debilitan permitiendo de nuevo el paso de componentes del espacio intersticial hacia el lumen del alveolo y también en sentido inverso. De hecho, la detección de una alta concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la leche facilita el diagnóstico de mastitis y de otros problemas en la lactancia (Morton, 1994). En esta situación, los productos secretados pueden salir de la glándula, mientras que las células inflamatorias y moléculas protectoras pueden entrar en el espacio luminal en mayor cantidad. Es importante señalar que, a pesar de las TJ, en condiciones normales algunas células del sistema inmunitario llegan a la leche atravesando entre las células epiteliales; las TJ se sellan a continuación para no dejar un espacio abierto permanente (Lin et al., 1995; Seelig y Beer, 1981).

Con el parto, hay un aumento en el ratio de secreción de sIgA y lactoferrina. La concentración de estas dos importantes proteínas protectoras es tan alta durante las primeras 48 h tras el nacimiento que juntas representan el 10% del peso del calostro. Sin embargo, no comparten el mecanismo de secreción; la lactoferrina es secretada por exocitosis mientras que la sIgA emplea la vía transcitótica. El calostro también contiene altas concentraciones de células somáticas, entre las que se incluyen linfocitos, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales desprendidas (Ho et al., 1979; Lawrence y Lawrence, 2005). La concentración de estos componentes (lactoferrina, sIgA y elementos celulares) disminuye rápidamente después del segundo día posparto.

### II.3.2. Calostro: composición y funciones biológicas

Desde el momento del parto, o en ocasiones unos días antes, y hasta el cuarto o quinto día posparto, la glándula mamaria produce una secreción denominada calostro (que no llega a alcanzar los 100 ml el primer día). Tiene color amarillento, consistencia densa y resulta de la mezcla de los materiales residuales presentes en las glándulas y en los conductos mamarios con la leche recién producida.

En comparación con la leche madura, el calostro contiene más proteínas (especialmente IgA y lactoferrina), oligosacáridos, vitaminas liposolubles (A, E, K) y minerales (Na, K, Cl), pero menos lactosa, citrato y grasa (Tabla 1) (Lawrence y Lawrence, 2005; Saint et al., 1984; Uruakpa et al., 2002). Estos rasgos están en concordancia con las reservas nutritivas y necesidades del recién nacido, cuyo aparato digestivo y sistema inmunitario distan mucho de ser maduros. A pesar del menor contenido en lactosa, lípidos y glucosa en comparación con la leche madura, los nutrientes del calostro son fácilmente asimilables por el recién nacido. Sin embargo, lo más llamativo del calostro es la variedad de macromoléculas con un papel bioprotector (Neville y Morton, 2001).

Aunque el recién nacido posee una cierta inmunidad humoral debido a las Igs que pasan a través de la placenta al feto durante el embarazo, el calostro (y la leche después) ofrecen a las mucosas, en especial a la intestinal, una protección vital frente a las infecciones hasta que el intestino del recién nacido madure y pueda secretar sus propias Igs (Butler, 1979; Jelliffe y Jelliffe, 1981). La abundancia de sIgA, células somáticas, lactoferrina y oligosacáridos, entre otros, hace que el calostro se asemeje a un cóctel inmunitario. Las sIgA provienen en parte del suero y en parte de la síntesis en la glándula mamaria, llegando a alcanzar una concentración de 60 mg/ml en el calostro. Estas IgA, que son estables a valores de pH bajos y son resistentes a la acción de enzimas proteolíticas, dan protección al intestino del recién nacido frente a infecciones (Lawrence y Lawrence, 2005; Van de Perre, 2003). Concretamente, actúan como una de las primeras líneas de defensa frente a los microorganismos potencialmente patógenos que pudieran atravesar la membrana intestinal.

**Tabla 1.** Composición del calostro y de la leche madura<sup>a</sup>

<b>Componente</b>	<b>Calostro/100 ml</b>	<b>Leche/100 ml</b>
Energía (Kcal)	58	70-75
Agua (%)	87,2	88
Lactosa (g)	5,3	7,3
Oligosacáridos (g)	1,9	1,3
Proteínas totales (g)	2,3	0,9
Caseína (mg)	140	187
$\alpha$ -lactoalbúmina (mg)	218	161
Lactoferrina (mg)	330	167
IgA (mg)	364	142
NNP <sup>b</sup> (mg)	47	42
Grasa total (g)	2,9	4,2
Triacilglicéridos (g)	2,7	4,1
Fosfolípidos (mg)	3,1	2,5
Colesterol (mg)	27	16
Vitamina A ( $\mu$ g)	89	47
$\beta$ -caroteno ( $\mu$ g)	112	23
Vitamina D ( $\mu$ g)	-	0,04
Vitamina E ( $\mu$ g)	1280	315
Vitamina K ( $\mu$ g)	0,23	0,21
Tiamina ( $\mu$ g)	15	16
Vitamina B6 ( $\mu$ g)	12	28
Vitamina B12 ( $\mu$ g)	200	26
Ácido ascórbico ( $\mu$ g)	4,4	4
Calcio (mg)	23	28
Magnesio (mg)	3,4	3
Sodio (mg)	48	15
Potasio (mg)	74	58
Cloro (mg)	91	40
Fósforo (mg)	14	15
Cobre ( $\mu$ g)	46	35
Yodo ( $\mu$ g)	12	7
Hierro ( $\mu$ g)	45	40
Cinc ( $\mu$ g)	540	166

<sup>a</sup> Modificada de Lawrence y Lawrence (2005)<sup>b</sup> NNP, nitrógeno no proteico.

Respecto a las células somáticas, el calostro proporciona al recién nacido hasta  $10^8$  células por día (Michie, 1998). La mayoría de estas células son macrófagos (50% del total) que tienen actividad fagocítica y secretan factores inmunoreguladores. El



calostro también contiene linfocitos B y T, siendo estos últimos más frecuentes para compensar la inmadurez de las células T del neonato. Los neutrófilos presentes en el calostro procedentes de la circulación materna parecen estar más involucrados en la autoprotección de la glándula mamaria (por ejemplo, frente a mastitis infecciosas) que en el desarrollo del sistema inmunitario del niño (Field, 2005).

La lactoferrina es una glicoproteína de la familia de las transferrinas con capacidad de captar hierro, lo que le confiere propiedades antimicrobianas, antivirales, aintinflamatorias e inmunomoduladoras (Steijns y Hooijdonk, 2000). Swart et al. (1998) demostraron *in vitro* en células y fibroblastos el efecto anti-VIH de la lactoferrina purificada de calostro y leche. La lactoferrina también actúa en combinación con la sIgA y la lisozima, igualmente presentes en el calostro, aumentando la protección de este fluido frente a un amplio espectro de agentes patógenos (Kussendrager, 1993).

Además de los componentes inmunitarios, el calostro contiene una variedad de sustancias con distintas actividades biológicas de gran valor para la defensa y el desarrollo del recién nacido, como se recoge en la Tabla 2. Por ejemplo, la lactoferrina al captar hierro, además del efecto antimicrobiano y viral anteriormente mencionado, facilita la absorción de este micronutriente en el intestino del lactante (Uruakpa et al., 2002). Se cree que también tiene un papel importante en la regulación del crecimiento de las células epiteliales del intestino del neonato (Playford et al., 2000).

Por otra parte, el calostro es rico en  $\beta$ -caroteno, responsable de su característico color amarillo y de una parte de su notable poder antioxidante, necesario para reducir el estrés oxidativo y evitar el daño del material genético (Buescher y McIlheran, 1988; Lindmark-Månsson y Akesson, 2000). También debe destacarse que contiene, en relación con la leche madura, mayor concentración de fosfolípidos y un notable contenido en ácido araquidónico y ácido docosahexanoico (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga) fundamentales para el desarrollo del sistema nervioso central. Parece ser que estos ácidos grasos esenciales son más fácilmente asimilables para un organismo aún inmaduro (Sala-Vila et al., 2005).

**Tabla 2.** Actividad biológica de algunos componentes del calostro

<b>Componente</b>	<b>Función biológica</b>
Lactoferrina	Actividad antimicrobiana y viral Absorción de Fe en el intestino del lactante Regulación del crecimiento de células intestinales
IgA (mayoritaria en el calostro), IgG e IgM	Protección frente a virus y bacterias
Lisozima (enzima bacteriolítica)	Control del desarrollo de la microbiota intestinal
Componentes celulares: Linfocitos Macrófagos	Síntesis de IgA Almacenamiento y transporte de Igs
Citoquinas	Actividad antiinflamatoria Actividad inmunomoduladora Promoción del crecimiento Actividad quimiotáctica
Oligosacáridos (contienen ácido <i>N</i> -acetilneuramínico)	Prebióticos Fuente de ácido siálico para el tejido nervioso

Fuentes: Carlson (1985); Lawrence y Lawrence (2005); Playford et al. (2000); Uruakpa et al. (2002)

La composición del calostro pone de manifiesto que es un alimento clave para la nutrición, el crecimiento y el desarrollo del recién nacido en los primeros días de vida. Aunque hasta la fecha no hay muchos estudios al respecto, el calostro podría aportar un número significativo de bacterias comensales para la colonización del intestino. Además, la abundancia de oligosacáridos en el calostro facilitaría el establecimiento de una microbiota intestinal deseable. Este efecto se conoce como “factor *bifidus*” o “factor bifidogénico” (Lawrence y Lawrence, 2005).

### II.3.3. Leche materna: composición y funciones biológicas

La leche secretada entre los días 4 y 15 posparto, entre el calostro y la leche madura, se denomina leche de transición. Durante esta etapa se registra un aumento brusco en la producción de leche, que seguirá hasta alcanzar un volumen de 600-700 ml/día los primeros 30 días y 700-900 ml/día de media durante los 6 primeros meses posparto. La composición química de la leche varía a lo largo de la toma y también a medida que avanza la lactación: la concentración de Igs, proteínas totales y vitaminas liposolubles disminuye, mientras que aumenta la de lactosa, lípidos y vitaminas hidrosolubles junto con el contenido calórico total (Tabla 1). Las propiedades e

importancia de la leche materna se deben a la compleja mezcla de carbohidratos, lípidos, proteínas, minerales, nucleótidos, vitaminas y compuestos bioactivos que la forman.

La lactosa, disacárido típico de la leche formado por glucosa y galactosa, es el carbohidrato mayoritario de la leche materna. Juega un papel muy importante en la producción de la leche, ya que la cantidad de agua presente en este fluido biológico depende de la síntesis de lactosa, siendo el componente menos variable de la leche. Este disacárido es fácilmente hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa o lactasa presente en el intestino del neonato, constituyendo su principal fuente de energía (Hurley, 2007a y b).

Los lípidos de la leche están compuestos por una compleja mezcla de triacilglicéridos (98%), fosfolípidos (0,8%) y colesterol (0,5%), entre otros, que representan entre el 50% y el 60% de las calorías de la leche. Como se ha comentado con anterioridad, se secretan en forma de glóbulos emulsionados en la fase acuosa de la leche, en los que también quedan protegidos algunos compuestos bioactivos y vitaminas liposolubles. La composición en ácidos grasos de los triacilglicéridos varía en función de la dieta materna. Tras el nacimiento, la leche materna proporciona grasa para las reservas adiposas del recién nacido hasta que sea capaz de metabolizarlas y usarlas como fuente de energía, lo que sucede unos días después (Hurley, 2007a y b; Jensen, 1999).

Otro componente mayoritario de la leche son las proteínas, que tienen un perfil de aminoácidos esenciales perfecto para el crecimiento y desarrollo del recién nacido. Las más abundantes son las caseínas, que se estructuran en forma de micelas fácilmente digeribles en el intestino. Por otra parte, las proteínas del suero, como  $\alpha$ -lactoalbúmina, Igs y seroalbúmina, son cuantitativa y cualitativamente específicas de cada especie de mamífero (Hurley, 2007a y b).

Los minerales que se encuentran en mayor cantidad son el calcio y el fósforo, necesarios para el rápido crecimiento de los huesos y el desarrollo de otros tejidos del recién nacido. Ambos están asociados a la estructura micelar de las caseínas (Hurley, 2007). Además de los componentes mayoritarios, la leche y el calostro son fuentes

singulares de una gran variedad de sustancias bioactivas, como se resume en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Actividad biológica de los principales componentes de la leche humana<sup>a</sup>

Proteínas y péptidos	Caseínas $\alpha$ y $\beta$	Transporte de minerales (Ca, Fe, Zn, Cu) Precusores de péptidos bioactivos
	Glicomacropéptido	Actividad antiviral Factor bifidogénico Precursor de péptidos bioactivos
	Proteínas del suero:	
	• Lactoferrina	Absorción de hierro Actividad antimicrobiana y antioxidante Inmunomodulación Actividad anticarcinogénica
	• Lisozima	Actividad antimicrobiana (efecto sinérgico con Igs y lactoferrina)
Lípidos	• Inmunoglobulinas (sIgA, IgG, IgM)	Protección inmunológica
	• $\alpha$ -Lactalbúmina	Síntesis de lactosa en glándula mamaria Transporte de Ca Actividad anticarcinogénica (induce apoptosis de tumores) en asociación con el ácido oleico
	• Otras enzimas: glutatión peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa	Actividad antioxidante
	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga: ácidos araquidónico y docosahexanoico	Desarrollo neurológico, cognitivo y de la función visual
	Ácidos grasos de cadena corta	Actividad antimicrobiana Actividad anticarcinogénica Protección del epitelio intestinal
Glúcidos	Ácido linoleico conjugado	Actividad anticarcinogénica Factor de crecimiento
	Oligosacáridos	Prebióticos
Otros	Mucinas	Ligandos para microorganismos
	Poliaminas	Maduración y desarrollo del epitelio intestinal Inmunomodulación
	Nucleótidos y nucleósidos	Inmunomodulación Desarrollo y funcionamiento del epitelio intestinal Metabolismo lipídico
	Hormonas y factores de crecimiento	Regulación de distintas funciones
	Microbiota comensal (probióticos)	Colonización del intestino Protección frente a infecciones Desarrollo del sistema inmunitario Desarrollo cognitivo
	Células del sistema inmunitario	Protección inmunológica
	Membrana del glóbulo graso	Inhibición de infección por virus

<sup>a</sup>Adaptado de Donovan (2006) y Hamosh (2001).

Uno de los componentes más importantes y menos estudiado de la leche materna es su microbiota. Sin embargo, todavía son muy escasos los estudios sobre la microbiología de la leche humana obtenida de mujeres sanas, lo cual no es de extrañar ya que, hasta hace muy pocos años, se consideraba que este fluido era estéril. Sólo en algunos casos se ha realizado la detección e identificación de bacterias potencialmente patógenas en leche almacenada en bancos (El-Mohandes et al., 1993; Lindemann et al., 2004; Ng et al., 2004; Tyson et al., 1982; Wright y Fenny, 1998), en casos de mastitis (Matheson et al., 1988; Osterman y Rahm, 2000) o en infecciones neonatales (Bingen et al., 1992; Le Thomas et al., 2001).

Los estudios realizados hasta la fecha indican que, entre las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia, destacan diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc* (Eidelman y Szilagyi, 1979; Gavin y Ostovar, 1977; Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003; Ng et al., 2004; Martín et al., 2006; Rodríguez et al., 2006c; West et al., 1979). En cuanto a las especies, destaca *Staphylococcus epidermidis*, tanto en distribución (se encuentra prácticamente en la leche de todas las mujeres lactantes sanas) como en lo que respecta a su concentración en dicho fluido ( $\sim 10^3$  ufc/ml). El hecho de que bacterias pertenecientes a los géneros anteriormente citados se puedan aislar fácilmente de leche materna obtenida en países muy diferentes (en términos geofísicos, socio-económicos y/o culturales) sugiere que su presencia no es un fenómeno aislado sino que, al contrario, se trata de un evento común. Por lo tanto, sería lógico considerar que tales bacterias no son el resultado de una mera contaminación de la leche sino que realmente constituyen la microbiota natural de este fluido biológico.

Recientemente, la aplicación de métodos moleculares, que no requieren el cultivo previo de los microorganismos, ha confirmado que la leche materna es una buena fuente de estafilococos, estreptococos y bacterias lácticas. Además, con estos métodos se ha demostrado que algunas bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, también están ampliamente difundidas en la leche humana (Martín et al., 2007a). Esta última observación no debe considerarse anómala ya que la microbiota del intestino del lactante suele ser un fiel reflejo de la existente en la leche materna

(Heikkilä y Saris, 2003). Estudios recientes han revelado que *E. coli* puede encontrarse entre las primeras especies que colonizan el intestino neonatal (Adlerberth et al., 1991; Favier et al., 2002).

La leche humana es uno de los factores clave en la iniciación y el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato ya que este fluido garantiza un aporte continuo de bacterias durante todo el periodo de lactancia. De hecho, posiblemente se trate de la principal fuente de bacterias para el recién nacido, ya que se estima que un lactante que ingiera aproximadamente 800 ml de leche al día recibe entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  bacterias (Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003). Por lo tanto, y como se ha comentado anteriormente, no es de extrañar que la microbiota intestinal del lactante refleje la existente en la leche materna.

El número de especies bacterianas existentes en la leche de mujeres sanas es bajo, oscilando entre 2 y 12 en cada mujer (Martín et al., 2007a). A pesar de ello, existe una gran variabilidad interindividual, de tal manera que la leche de cada mujer tiene una composición bacteriana única, de forma análoga a lo que sucede con la microbiota intestinal de niños y adultos (Dicksved et al., 2007; Vaughan et al., 2005).

El origen de las bacterias presentes en la leche humana es objeto de controversia. Globalmente, estudios recientes (Martín et al., 2004; Langa, 2006; Pérez et al., 2007) sugieren que, al menos una parte sustancial de las bacterias comensales existentes en la leche materna, podrían proceder de la microbiota intestinal de la madre y accederían al epitelio de la glándula mamaria a través de la ruta enteromamaria que se trata con detalle en el Capítulo 5.

#### **II.3.4. Fórmulas infantiles**

La leche es el alimento óptimo e ideal para nutrir al recién nacido durante sus primeros meses de vida. La OMS en el año 2000 declaró que la leche de mujer es el patrón de oro para la alimentación del lactante de 0 a 6 meses de edad, ya que es una mezcla única de nutrientes y componentes funcionales para la nutrición óptima del lactante y del niño pequeño y es el determinante más importante de su salud,

crecimiento y desarrollo (Michaelsen et al., 2000). De hecho, se cree que el éxito del desarrollo de los mamíferos viene del valor de la leche como alimento inicial (Robinson, 2008). Los procesos biológicos necesarios para movilizar las biomoléculas esenciales que contiene la leche desde las reservas maternas y convertirlas en estructuras solubles, transportables y biodisponibles en la leche son admirables (German et al., 2006).

A pesar de ello, en ocasiones, por problemas de salud (mayoritariamente injustificados), motivos sociales o simplemente porque la mujer ha decidido que no va a lactar a su hijo, se emplean fórmulas artificiales para alimentar al recién nacido. Éstas constituyen una solución aceptable y, en un intento de asemejarse a la leche de mujer, están en constante evolución, a medida que se identifican nuevos componentes en la leche humana y/o varían las recomendaciones de las necesidades de nutrientes para lactantes (Trabazo, 2005).

El término “fórmula láctea infantil” se emplea para designar productos destinados a la alimentación de los lactantes, adecuados para sustituir total o parcialmente a la leche humana, que deben cubrir las necesidades nutritivas en esta etapa de la vida (Pavón et al., 2007). El Comité de Nutrición de la Asociación Americana de Pediatría (AAP, 1998), el de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (en inglés, ESPGHAN) (Koletzko et al., 2005) y el Comité Científico de Alimentación de la Comisión Europea (SCF, 2003) han establecido unas recomendaciones sobre las características cualitativas y cuantitativas que deben reunir las fórmulas lácteas destinadas a la alimentación del lactante. Existen dos tipos de fórmulas: las de inicio, recomendadas desde el nacimiento hasta los 4-6 meses, y las de continuación, desde los 4-6 meses de edad en adelante (Pavón et al., 2007).

En España, según el Real Decreto (RD) 867/2008, de 23 de mayo de 2008, los “preparados para lactantes” se definen como los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros meses de vida, que satisfagan por sí mismos las necesidades nutritivas de estos lactantes hasta la introducción de una alimentación complementaria apropiada. Y los “preparados de

continuación” como los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes cuando se introduzca una alimentación complementaria apropiada que constituyan el principal elemento líquido de una dieta progresivamente diversificada de estos niños (BOE, 2008). En este RD también se dan recomendaciones sobre la composición de las fórmulas para lactantes. Además, indica que los preparados para lactantes se elaborarán, según el caso, a partir de las proteínas de la leche de vaca, de hidrolizados de estas proteínas o de proteínas de soja solas o mezcladas con proteínas de la leche de vaca.

Las investigaciones realizadas durante los últimos años han detectado en la leche materna ciertos componentes que podrían adicionarse a las fórmulas lácteas infantiles. La normativa europea ha ido permitiendo la incorporación de estas sustancias, llamadas “funcionales”, a los preparados para lactantes y de continuación. Dichas sustancias no son obligatorias y sólo las contienen algunas fórmulas. A pesar de los esfuerzos realizados para mejorar las fórmulas infantiles mediante su complementación con nuevos componentes (taurina, carnitina, selenio, nucleótidos, oligosacáridos, probióticos...) se estima que al menos 100 componentes de la leche humana están ausentes, o presentes en cantidades prácticamente insignificantes, en las fórmulas infantiles (Ogundele, 2001). Por todo ello, se puede afirmar que la leche materna es un alimento simbiótico tan complejo que se puede considerar el paradigma de los alimentos funcionales.

### **II.3.5. El vínculo “intestino materno–glándula mamaria–intestino neonatal”**

La leche es el único alimento que ingiere el lactante durante algunos meses de vida y, en consecuencia, debe existir una relación íntima entre la función mamaria durante la lactancia y la función gastrointestinal durante los primeros meses de vida. Por lo tanto, no es de extrañar que la contribución de la leche materna a la adaptación del recién nacido a la vida extrauterina sea mayor a medida que disminuye el grado de desarrollo gastrointestinal en el momento del nacimiento. La leche representa un conjunto ideal de nutrientes convenientemente preparados para su transferencia de la madre al hijo pero, además, contiene un amplio espectro de factores no nutricionales que son básicos para una correcta adaptación perinatal. En este sentido, el intestino



neonatal depende de estos componentes no nutritivos de la leche para compensar la inmadurez de algunas de sus funciones, como la digestiva, la de barrera, la inmunológica o la neurológica.

El nicho ecológico del feto es el útero donde, suspendido en el líquido amniótico, disfruta de una relación permanente con su madre a través de la placenta. La deglución y circulación de este líquido, que contiene enzimas, Igs, hormonas, citoquinas e incluso bacterias, contribuye a que la mucosa gastrointestinal se vaya preparando para sus tareas posnatales. La placenta es un órgano especializado en el intercambio de nutrientes, gases y otras sustancias entre la madre y el feto durante el periodo prenatal. Tras el nacimiento, el neonato cambia el aporte continuo de factores nutricionales y no nutricionales que representaba la placenta por el suministro intermitente de tales factores a partir de la glándula mamaria en forma primero de calostro y posteriormente de leche. En consecuencia, la glándula mamaria constituye el nicho ecológico del neonato ya que, hasta que se produzca el destete, va a depender de un fluido con una composición muy regulada. En otras palabras: el neonato lactante puede ser considerado como un feto “extragestacional” en el que la glándula mamaria recoge el testigo de la placenta. En este contexto, la mucosa intestinal de la madre, el epitelio de su glándula mamaria y la mucosa intestinal del lactante son complementarias tanto en estructura como en función, de forma similar a lo que sucede entre las membranas que componen la barrera placentaria (Figura 10).

Así, el intestino materno es un órgano clave en el proceso de capacitación de la glándula mamaria para satisfacer las necesidades del niño ya que constituye su principal fuente de agua, electrolitos y principios inmediatos (ácidos grasos, aminoácidos, glucosa...), componentes del sistema inmunitario e incluso de las bacterias que colocarán el andamiaje para la creación de una microbiota intestinal compleja. A su vez, la glándula mamaria realiza una serie de transformaciones para ajustar en cada momento las características de la leche al grado de desarrollo del niño (McManaman y Neville, 2003). Por ejemplo, la composición del calostro y la leche en una madre que haya tenido un niño prematuro es distinta de la de una que lo haya tenido a término pero, en cualquier caso, siempre en beneficio del neonato (Aguayo, 2001). Finalmente, el intestino del neonato es el encargado de procesar y/o “reorientar”

correctamente el contenido de la leche para asegurar que el crecimiento del niño sea óptimo (Figura 10). En resumen, el intestino de la madre, su glándula mamaria y el intestino neonatal deben estar perfectamente sincronizados.

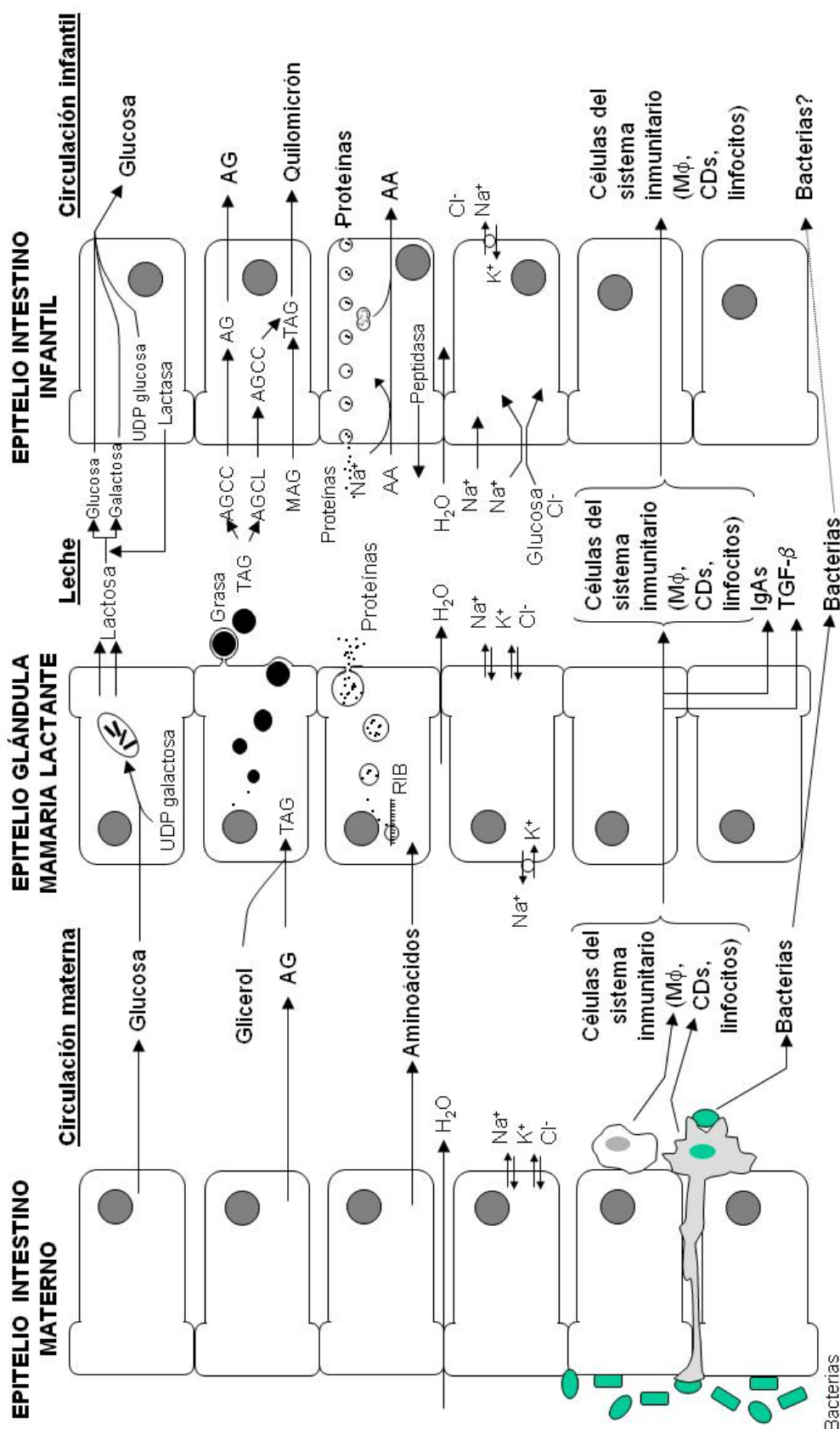
El neonato es un ser inmaduro y, en este sentido, el calostro y la leche deben aportar los elementos necesarios para cubrir las “deficiencias” provisionales. Entre ellas, nos detendremos en dos particularmente ilustrativas:

(1) El intestino humano adulto contiene alrededor de 100 billones de bacterias. Esta microbiota intestinal se encarga de toda una serie de funciones esenciales para la fisiología del hospedador pero la cantidad de bacterias en el intestino neonatal es muy baja. ¡No hay que alarmarse! El calostro y la leche van a proporcionar las bacterias que crearán las condiciones necesarias para una microbiota compleja y estable. El estudio del ecosistema intestinal hace necesario el empleo de técnicas cada vez más complejas y especializadas, aunque todavía estamos lejos de conocer la composición real de la microbiota intestinal y su impacto sobre el hospedador. Como se ha comentado anteriormente, existen indicios que sugieren que la leche materna es el vehículo por el que ciertas bacterias del intestino de la madre se transfieren al intestino del lactante (Martín et al., 2004). Además, tales bacterias pueden llegar prácticamente indemnes al intestino infantil ya que, aparte del efecto protector de la leche, tanto la acidez del estómago como el tiempo de retención en dicho órgano son mucho menores en los niños de corta edad que en los adultos.

(2) El intestino adulto es el principal órgano del sistema inmunitario en las personas adultas pero el tejido linfoide asociado al intestino neonatal se encuentra en un estado de total inmadurez. Nuevamente, la leche viene al rescate ya que proporciona toda una serie de componentes que ejercen una doble función; por una parte confieren un notable grado de protección pasiva de una forma prácticamente instantánea mientras que, por otra, suponen el estímulo para la maduración de las células epiteliales e inmunitarias de la mucosa infantil. De hecho, incluso se establece una conexión específica entre el intestino y la glándula mamaria durante el último tercio de embarazo y la lactancia: la circulación enteromamaria (Roux et al., 1977; Salmon et al., 1984). Se trata de un proceso regulado, responsable del acúmulo de

células del sistema inmunitario de origen intestinal en la glándula mamaria lactante y que podría explicar la presencia de bacterias de origen intestinal en la glándula mamaria (Tanneau et al., 1999).

Obviamente, existen muchísimas más relaciones, paralelismos e influencias entre el intestino (materno y/o neonatal) y la glándula mamaria que las citadas hasta este momento. Podríamos hablar de su origen ectodérmico común, de sus funciones hormonales, de las disbiosis que una antibioterapia inadecuada causa en ambos órganos (conduciendo a episodios de diarrea o mastitis infecciosas, respectivamente), de los notables cambios anatómicos y fisiológicos que la lactancia provoca en el intestino e, incluso, de la importancia de la interacción leche-intestino en la estimulación del eje vago-cerebro, una conexión esencial para la adquisición de ciertas funciones cognitivas durante la infancia. Pero, además, no conviene olvidar que para muchas culturas antiguas el intestino era el lugar donde residía el alma y desde donde afloraban las emociones (mucho antes de que se descubriera la complejidad del sistema nervioso entérico y se le etiquetara como nuestro “segundo cerebro” (Gershon, 1998)); al fin y al cabo, el amamantamiento no supone únicamente una forma de alimentación completa sino un proceso de comunicación entre madre e hijo tan sutil como complejo: todo un intercambio de estímulos y emociones.



**Fig. 10.** Complementariedad entre la estructura y función de los epitelios del intestino materno e infantil y el de la glándula mamaria lactante, ilustrando la síntesis, transferencia, utilización y/o absorción de algunos de los componentes de la leche materna. AA: aminoácidos; AG: ácidos grasos; AGCC: ácidos grasos de cadena corta; AGCL: ácidos grasos de cadena larga; CDs: células dendríticas; Mφ: macrófagos; MAG: monoacilglicéridos; RIB: ribosomas; TAG: triacilglicéridos.

Adaptado de Weaver (1992).

## II.4. TRANSLOCACIÓN BACTERIANA EN EL INTESTINO MATERNO

### II.4.1. Definición de translocación

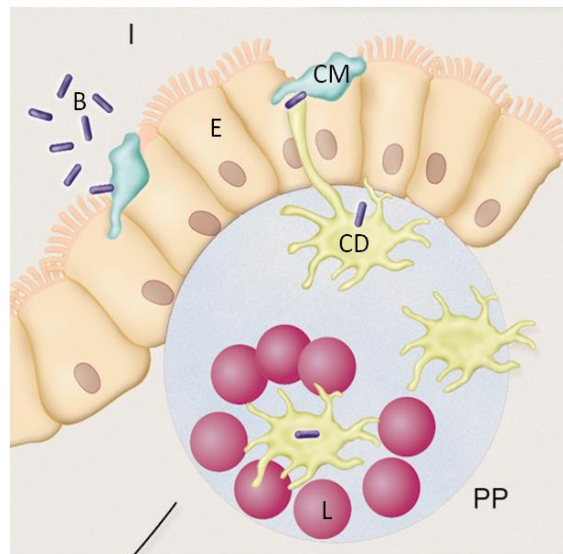
La primera vez que se utilizó el término de “translocación” fue en 1966 para describir en ratas el paso de bacterias (*Serratia marcescens*) desde el duodeno, donde habían sido inoculadas, hasta la linfa (Wolochow et al., 1966). Pero hasta 1979 no se definió el término translocación bacteriana como el paso de bacterias viables del tracto gastrointestinal (TGI) hacia la lámina propia y, posteriormente, hacia los ganglios linfáticos mesentéricos y otros órganos extraintestinales como bazo, hígado, riñón, cavidad peritoneal o torrente sanguíneo (Berg y Garlington, 1979). Se ha sugerido que las bacterias comensales del intestino poseen una tasa baja de translocación en los hospedadores sanos: entre un 5% y un 10% en humanos y un 10% y un 20% en animales (Berg, 1995; Lichtman, 2001; Steinwender et al., 1996).

Las causas a las que se atribuye la translocación bacteriana, y que han sido identificadas hasta el momento, son: (1) sobrecrecimiento bacteriano intestinal, (2) deficiencias en el sistema inmunitario del hospedador, (3) aumento de la permeabilidad o daño en la barrera de la mucosa intestinal, y (4) peristaltismo disminuido (Berg, 1995). Como los componentes de la microbiota del intestino son los principales protagonistas de la translocación bacteriana, no es de extrañar que su concentración y composición sea un factor inductor importante (Yahima et al., 2001).

### II.4.2. Mecanismos de translocación

La mucosa intestinal está cubierta por una monocapa de células epiteliales que son inaccesibles para los patógenos debido a que su superficie luminal tiene forma de cepillo y está cubierta de mucus, al peristaltismo del intestino y a las TJ entre células adyacentes. Por ello, la entrada de patógenos, como por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* o *Clostridium jejuni*, ocurre principalmente a través de células epiteliales especializadas, las células M que se encuentran en las placas de Peyer, mediante la expresión de proteínas de invasión e inducción de su propia fagocitosis (Figura 11) (Neutra et al., 1996; Neutra, 1999).

En algunos casos, como sucede con los estreptococos del grupo B, *Helicobacter pylori* o *Haemophilus influenzae*, los patógenos translocan a través de la capa epitelial por una vía transcelular, por asociación con las TJ entre células epiteliales sin romper la continuidad de la mucosa (Soriani et al., 2006). Ciertos microorganismos aeróbicos, como *E. coli*, *Proteus mirabilis* o *Klebsiella pneumoniae*, sobreviven tras la translocación más fácilmente que los anaerobios, más numerosos en el intestino, debido posiblemente al oxígeno presente en la sangre (Litchman, 2001).



**Fig. 11.** Translocación bacteriana a través de la mucosa intestinal. B, bacterias; CM, Célula M; E, Enterocito; CD, Célula Dendrítica; PP, Placa de Peyer; L, Linfocito.  
Fuente: Uhlig y Powrie (2003).

En 2001 Rescigno et al. demostraron que algunas bacterias comensales no invasivas pueden atravesar dicha mucosa mediante un mecanismo dirigido por las células dendríticas existentes en la lámina propia. Estas células pueden abrir las TJ existentes entre las células epiteliales preservando la integridad de la membrana, emitir dendritas y captar bacterias viables para introducirlas en la lámina propia (Figura 11), manteniendo la integridad del epitelio intestinal (Rescigno et al., 2001).

Normalmente el sistema inmunitario defensivo del hospedador destruye las bacterias que han translocado, pero en algunos estudios se han observado bacterias comensales viables durante varios días unidas a las células dendríticas (Macpherson y Uhr, 2004; Langa, 2006) y a los macrófagos (Watanabe et al., 2007). Este hecho permitiría a las bacterias, una vez dentro de las células dendríticas o de otras células como los linfocitos o los macrófagos, propagarse

por el sistema linfático asociado a las mucosas y llegar a mucosas distantes como las de los tractos respiratorio y genitourinario, las glándulas salivares y lacrimales e incluso la glándula mamaria de las mujeres embarazadas y/o lactantes (Roitt, 1994).

Se sabe además que, durante el periodo de lactancia, se produce una acumulación selectiva de células del sistema inmunitario en la glándula mamaria mediante un proceso regulado por las hormonas lactogénicas (Bertotto et al., 1991). De hecho, se ha demostrado que la colonización de la glándula mamaria de ratonas preñadas o lactantes coincide con un aumento en el aislamiento de bacterias en cultivos de muestras de sangre, bazo e hígado. Además, mientras en condiciones patológicas las bacterias aisladas son fundamentalmente Gram-negativas, en ratonas preñadas o lactantes pertenecen, entre otros, a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Pérez et al., 2007).

#### II.4.3. Implicaciones

La translocación bacteriana en humanos se ha estudiado en ciertos pacientes (quemados, transplantados, aquejados de pancreatitis o con problemas cardiopulmonares, enfermos de SIDA) en los que las bacterias, normalmente patógenas, se han diseminado por todo el cuerpo causando sepsis, fallos multiorgánicos y, en ocasiones, la muerte (Lichtman, 2001). Sin embargo, la translocación bacteriana también se observa en individuos sanos y sin causar efectos perjudiciales para el hospedador (Berg, 1995; Berg y Garlingotn, 1979; Rodríguez et al., 2001). En un estudio llevado a cabo con 132 pacientes a los que se les realizó una laparatomía, cinco mostraron resultados positivos en los cultivos de muestras de sangre; los microorganismos aislados eran del género *Staphylococcus*, que carecían de rasgos patógenos y además no estaban relacionados con la morbilidad de los pacientes (Moore et al., 1992).

Se ha sugerido que la translocación desde el intestino hacia los tejidos extraintestinales es un hecho fisiológico beneficioso asociado con la estimulación del sistema inmunitario, con la formación del sistema inmunitario neonatal o como vía de comunicación madre-hijo (Bengmark y Jeppsson, 1995; MacFie, 2004; Pérez et al., 2007). El hecho de que la translocación bacteriana ocurra en individuos sanos explicaría los efectos extraintestinales que ejercen ciertas bacterias probióticas. Reid et al. (2003) realizaron un estudio clínico en el que demostraron la capacidad de ciertos lactobacilos probióticos administrados oralmente a



mujeres con infecciones vaginales, de llegar a la mucosa vaginal por vía endógena y ejercer un efecto antiinfeccioso.

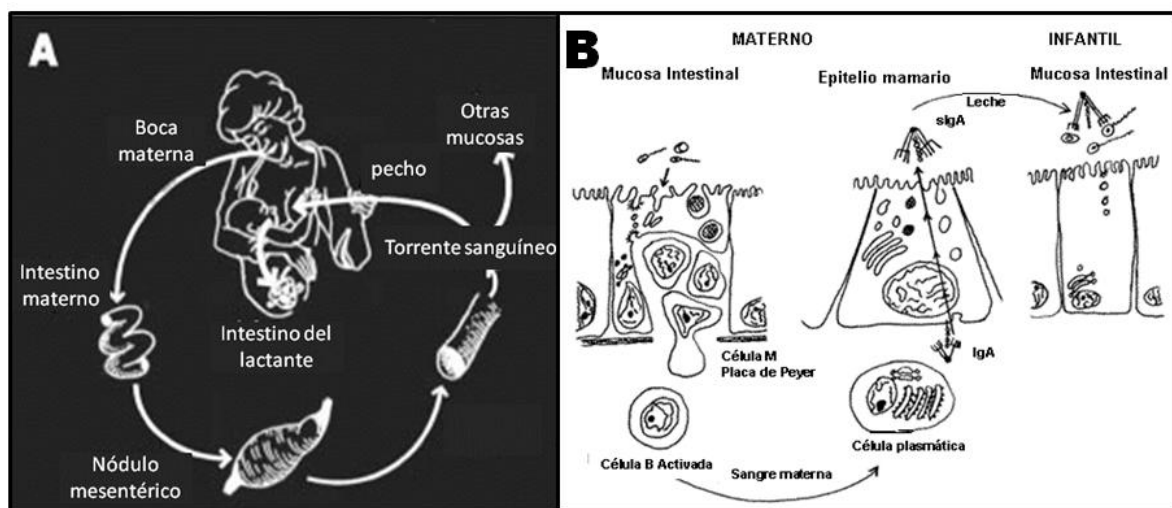
## II.5. LA CIRCULACIÓN ENTERO-MAMARIA

En el Capítulo 3 se ha hecho referencia a la composición del calostro y de la leche materna, resaltando la presencia en estos fluidos de células del sistema inmunitario e Igs. Ahora, cabe preguntarse ¿de dónde proceden estas células? ¿Son iguales a las células presentes en la sangre o en los nódulos linfáticos? O, por el contrario, ¿se originan en la glándula mamaria? Al menos en ratones, humanos y cerdos, parece ser que algunas de estas células, en especial los linfocitos B productores de IgA, derivan de la mucosa intestinal y alcanzan la glándula mamaria a través del denominado circuito entero-mamario (Roux et al., 1977; Salmon et al., 1984). Para entender mejor cómo funciona y en qué consiste dicho circuito entero-mamario es necesario explicar primero brevemente la organización y el funcionamiento del sistema inmunitario de las mucosas. Aunque nos centraremos en la mucosa intestinal, por ser el principal punto inductor de la inmunidad del cuerpo humano, las estructuras descritas y su funcionamiento son equivalentes a lo que se encuentra en otras mucosas, como por ejemplo la del tracto respiratorio.

La mucosa intestinal tiene una extensión total de 300 m<sup>2</sup> por lo que, sin duda, constituye la mayor interfase entre el sistema inmunitario y el medio externo, siendo la principal puerta de entrada de antígenos al cuerpo humano. No debe extrañar, por tanto, que el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT, del inglés *gut-associated lymphoid tissue*) sea el mayor órgano del sistema inmunitario humano (10<sup>6</sup> linfocitos/g), conteniendo el 85% del total de células inmunocompetentes de un individuo adulto sano (Brandtzaeg et al., 1989) y produciendo el 67% del total de Igs (Salminen et al., 1998). La mayoría de las células intestinales se dedican a la absorción de nutrientes (como azúcares o aminoácidos), pero algunas se han modificado para permitir la entrada de antígenos. Éstas son las células M situadas en las placas de Peyer, encargadas de transportar los antígenos para que contacten con otras células inmunitarias (Blum et al., 2005). El intestino delgado contiene alrededor de 250 placas de Peyer (agregados de 5 ó más folículos) y miles de folículos linfoides aislados, aumentando este número en el colon.



Cuando una madre lactante ingiere un antígeno, éste viaja por su TGI hasta ser absorbido por las células M de las placas de Peyer (Figura 12A). Debajo de éstas se encuentran las células dendríticas, que lo presentan a las células T. La respuesta de las células T es la secreción de determinadas citoquinas, entre las que destaca el factor de crecimiento transformador  $\beta$ , (TGF- $\beta$  del inglés, *Transforming Growth Factor*), implicadas en la diferenciación de las células B a células productoras de IgA específicas para ese antígeno determinado (Figura 12B). Las células B activadas en los puntos inductores de la mucosa intestinal viajarán posteriormente por el torrente circulatorio hasta los puntos efectores como la glándula mamaria, donde producirán y secretarán grandes cantidades de IgA (Newburg, 2005; Newburg y Walker, 2007).



**Fig. 12.** Transferencia de inmunidad de la madre al lactante.

A: órganos, y B: mucosas implicadas.

Fuente: Newburg y Walker (2007).

Las IgAs producidas por las células plasmáticas en los puntos efectores son transportadas activamente a través de las células epiteliales de la glándula mamaria, liberándose a la leche materna el complejo denominado sIgA (ver apartado II.3.1.4) (McGhee y Kiyono, 1999; Newburg, 2005; Newburg y Walker, 2007). Las células B activadas en la glándula mamaria juegan un papel protector tanto para ese órgano como para el lactante. La protección de la glándula mamaria evita el posible desarrollo de un proceso infeccioso que pudiera destruir tejidos y estructuras mamarias, perjudicando el aporte de nutrientes al recién nacido.

El recién nacido es incapaz de desarrollar su propia respuesta inmunitaria local para proteger su mucosa intestinal, uno de los primeros lugares que van a entrar en contacto con los antígenos presentes en la leche y el ambiente. La protección pasiva de la mucosa intestinal del niño en su primera etapa después del nacimiento depende en gran medida de componentes inmunitarios contenidos en la leche materna (Hosea Blewett et al., 2008). Esta inmunidad está estrechamente ligada al intestino materno y al circuito enteromamario: el sistema inmunitario maduro de la madre transfiere a la leche materna células activadas e Igs que se transmiten directamente al bebé protegiéndole frente a patógenos (Figura 12) (Lawrence y Pane, 2007).

Otro papel que pueden jugar estas células (células dendríticas, macrófagos, etc.) es el de transportar bacterias comensales (Martín et al., 2004; Langa, 2006). En este sentido, Pérez et al. (2007) observaron mediante microscopía la asociación de bacterias a células mononucleares en muestras de leche y sangre de madres lactantes. Estas bacterias que transporta la leche serían una fuente importante de microorganismos para la colonización del intestino neonatal, además de formar parte de la educación del sistema inmune neonatal para diferenciar entre antígenos propios, antígenos procedentes de la dieta, organismos comensales y posibles patógenos (Martín et al., 2003; Pérez et al., 2007).

## II.6. RELACIONES ENTRE BACTERIAS Y SISTEMA INMUNITARIO

El cuerpo humano coexiste prácticamente desde el nacimiento con las comunidades bacterianas que se encuentran en todas las mucosas y epitelios comunicados con el exterior. La mayoría de estos microorganismos viven en el intestino (la superficie mucosa más extensa de nuestro organismo) y su número es, al menos, 10 veces mayor al de todas nuestras células somáticas y germinales juntas (Savage, 1977, Salminen e Isolauri, 2006). Se ha estimado que hay un mínimo de 500 especies bacterianas distintas, incluyendo la microbiota residente y las especies que colonizan temporalmente un nicho funcional vacío, aunque la mayoría son difíciles de cultivar *in vitro* (Savage, 1977). En el intestino, estas bacterias comensales interaccionan bioquímica, inmunológica y neurológicamente con el resto de células y sustancias que allí se encuentran. Esta relación se suele describir como comensal (una parte se beneficia mientras que la otra aparentemente no se ve afectada) pero, en realidad, es de mutualismo (ambas partes se benefician) (Bäckhed et al., 2005).

Numerosas investigaciones con modelos de animales axénicos (criados en condiciones de asepsia total) han puesto de manifiesto que la microbiota comensal, y en especial aquella que reside en el TGI, ejerce una influencia vital en el correcto desarrollo bioquímico y fisiológico del organismo que colonizan (Gordon y Pesti, 1971). Entre las importantes funciones para el hospedador en las que interviene la microbiota intestinal deben incluirse no sólo la metabólica y la protectora, sino también otras menos conocidas como la de contribuir a la maduración del TGI y la de regular la angiogénesis y la deposición de grasa (Tabla 4) (Bäckhed et al., 2005; Hooper, 2004; Neu et al., 2007; Stappenbeck et al., 2002).

**Tabla 4.** Funciones de la microbiota intestinal<sup>a</sup>

<b>Función</b>	<b>Efecto / mecanismo</b>
Nutritiva	Síntesis de vitaminas Degradación de paredes celulares vegetales no digeribles por el TGI humano (producción de ácidos grasos de cadena corta)
Protección	Contribución a la integridad de la barrera intestinal (ácidos grasos de cadena corta) Exclusión competitiva de patógenos Producción de ácidos y/o sustancias antimicrobianas Degradación de sustancias xenobióticas
Regulación de la angiogénesis	Estimulación de la formación de microvasculatura
Regulación hormonal	Influencia en homeostasis energética: modulación de leptina y ghrelina Metabolismo de estrógenos en el intestino
Inmunitaria	Contribuye a homeostasis intestinal por estimulación del GALT Interviene en la defensa de las mucosas por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulación/inhibición de la producción de citoquinas</li> <li>• Contribución a la maduración del sistema inmunitario</li> <li>• Inducción de la producción de IgA en los ganglios linfáticos mesentéricos</li> <li>• Desarrollo de la tolerancia oral</li> <li>• Estimulación de células presentadoras de antígenos</li> </ul> Colabora en el desarrollo de la tolerancia inmunitaria frente a bacterias comensales por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interacción con células epiteliales y dendríticas (receptores TLR)</li> <li>• Interacción con CD14</li> </ul>

<sup>a</sup>Adaptada de Domínguez-Bello y Blaser (2008).

En cuanto a la función metabólica, la microbiota presente en el colon fermenta carbohidratos de origen vegetal que no son digeridos por nuestras enzimas digestivas. Los productos metabólicos más importantes de esta fermentación son los ácidos grasos de cadena corta (principalmente acetato, butirato y propionato) que constituyen la principal fuente energética de las células del epitelio intestinal en el colon y participan en el control de varios procesos metabólicos (Cummings et al., 1987 y 2001). Además, estos ácidos grasos de cadena

corta favorecen la absorción de calcio, hierro y magnesio (Miyazawa et al., 1996; Roberfroid et al., 1995; Younes et al., 2001). La síntesis de numerosas vitaminas (biotina, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina, cianocobalamina o vitamina K) importantes para el hospedador humano también se debe a bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas presentes en el colon (Burgess et al., 2004; Conly et al., 1994; Hill, 1997; Quesada-Chanto et al., 1994; Sybesma et al., 2003).

La mucosa intestinal está en contacto directo y de manera continuada con el ambiente externo y, por lo tanto, es susceptible de ser colonizada e invadida por microorganismos ajenos. Sin embargo, las bacterias que componen la microbiota intestinal constituyen un ecosistema equilibrado que evita la colonización y/o proliferación por parte de los microorganismos exógenos potencialmente patógenos. Los mecanismos implicados en este efecto protector son la “exclusión competitiva”, es decir, la competencia por los sitios de unión a la superficie de las células epiteliales (Bernet et al., 1994), la competencia por los nutrientes disponibles en el nicho ecológico (Hooper y col, 1999) y la producción de sustancias antimicrobianas.

Pero, sin duda, la influencia de la microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmunitario es la función objeto de un mayor número de investigaciones. En primer lugar, el establecimiento de la microbiota intestinal determina el desarrollo del sistema inmunitario (Grönlund et al., 2000), actuando como un regulador esencial en las respuestas inmunitarias (Noverr y Huffnagle, 2004). Los estudios con animales axénicos han demostrado que estos animales presentan un gran número de alteraciones en el sistema inmunitario, como por ejemplo una baja densidad de células linfoides en la mucosa intestinal, estructuras foliculares linfocitarias pequeñas y una baja concentración de Igs circulantes en la sangre (Butler et al., 2000; Falk et al., 1998; Tannock, 2001). La inmadurez del sistema inmunitario de estos animales demuestra que la microbiota intestinal podría actuar como un importante estímulo inmunogénico permitiendo la maduración del GALT (Helgeland et al., 1996; Shroff et al., 1995). Dicha hipótesis queda demostrada cuando se induce experimentalmente la colonización bacteriana en estos animales y se comprueba la recuperación de la mayoría de los parámetros inmunitarios afectados por la ausencia de microorganismos. La introducción de una sola especie bacteriana en el intestino induce grandes cambios en la expresión génica de las células epiteliales y de la mucosa intestinal (Hooper et al., 2001). Así, por ejemplo, algunas bacterias intestinales comensales estimulan la aparición de células plasmáticas

productoras de IgA en la lámina propia de animales axénicos. Además, la capacidad de producir IgA va aumentando a medida que se regenera la compleja microbiota intestinal (Moreau et al., 1978; Shroff et al., 1995).

Por otra parte, las bacterias patógenas suelen expresar factores de virulencia que facilitan su entrada en las células del epitelio intestinal y la posterior invasión y colonización local o sistémica, dando lugar a una infección. Y ¿cómo reconoce el sistema inmunitario a las bacterias comensales y las diferencia de las patógenas? ¿Qué mecanismos explican que el intestino no se encuentre permanentemente en un estado de inflamación por la presencia de bacterias? Hasta hace poco tiempo se consideraba que la relación con las bacterias era competencia casi exclusiva del sistema inmunitario y que el epitelio intestinal actuaba como una simple barrera física. Sin embargo, actualmente se sabe que el epitelio intestinal contribuye de manera muy importante al mantenimiento de la homeostasis inmunitaria en el intestino: toma muestras del lumen intestinal, discrimina entre bacterias apatógenas y patógenas, e influye en las células presentadoras de antígenos y en los linfocitos (Artis, 2008; Magalhaes et al., 2007; Lu y Walker, 2001)

Los enterocitos y las células dendríticas expresan en su superficie celular dos sistemas principales de receptores que reconocen patrones moleculares conservados de las distintas especies bacterianas: la familia de los TLRs (del inglés, *Toll-Like Receptors*) y los NOD (del inglés, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) (Abreu et al., 2005; Cario, 2005). Estos receptores parecen ser cruciales para la comunicación bacteria-huésped en el intestino. Forman parte del sistema de reconocimiento bacteriano que funciona como un sistema de clave o contraseña. Cada cepa bacteriana, sea comensal o patógena, expresa un conjunto de moléculas específicas de ese microorganismo y cada una es reconocida de manera más o menos selectiva por uno de los diversos TLR presentes en la superficie de las células inmunitarias. Según la combinación específica de receptores activados por los correspondientes antígenos bacterianos, se activará la vía hacia la tolerancia (estado de no respuesta inmunitaria a ciertos antígenos “conocidos” o ubicuos) o se inducirá una respuesta inflamatoria.

Precisamente el establecimiento de la microbiota normal en el periodo neonatal representa un fuerte efecto estimulador para la maduración del GALT. El correcto funcionamiento de la comunicación entre la microbiota y el sistema inmunitario intestinal es

esencial ya que una hipersensibilidad en la infancia frente a las bacterias normales del intestino daría lugar a una respuesta inmunitaria aberrante y podría conducir a enfermedades inflamatorias crónicas en el adulto, como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa (Lupp y Finlay, 2005; Shanahan, 2002). El aumento en la incidencia de estas enfermedades inflamatorias crónicas (respuesta linfocitaria Th1) y alergias (respuesta linfocitaria Th2) en Europa y Estados Unidos a finales del siglo XIX coincidió con el aumento en la higiene personal y el avance de los sistemas de Salud Pública, por lo que se definió la “teoría de la higiene” (Strachan, 1989). Según dicha teoría, el estilo de vida moderno ha reducido el contacto temprano con los microorganismos, provocando una modificación de la microbiota intestinal, la cual es directamente responsable de la modulación del sistema inmunitario neonatal. Por tanto, mejorar la calidad de la microbiota intestinal podría ser una alternativa terapéutica válida para reducir el riesgo de determinadas enfermedades en el adulto, como por ejemplo mediante el uso terapéutico de los probióticos. Hasta el momento hay muchos estudios que apoyan su uso para tratar enfermedades inflamatorias, infecciosas y alérgicas (Shanahan, 2005; Yan y Polk, 2004).

La manipulación de la microbiota se está convirtiendo en una estrategia terapéutica real para muchas infecciones e inflamaciones del intestino (O’Hara y Shanahan, 2006). En los últimos años se ha popularizado el uso de probióticos en adultos y ya se ha iniciado su uso en nutrición infantil observándose, tal y como postula la teoría de la higiene, beneficios en la prevención de enfermedades como las alergias y la inflamación intestinal o reduciendo el riesgo de padecer infecciones (Gupta et al., 2000; Isolauri et al., 2000; Rosenfeldt et al., 2004; Tannock, 1997).

## **II.7. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA DEL NEONATO**

### **II.7.1. Meconio**

Durante su desarrollo en el útero, el feto adquiere los nutrientes que le proporciona la madre y elimina los productos de desecho que genera a través del cordón umbilical. Para iniciar el desarrollo de su TGI, el feto comienza a deglutir fluido amniótico hacia la semana 10 o 11. De hecho, el feto posee papilas gustativas ya maduras hacia la semana 12, las cuales influyen en la frecuencia con que deglute. El fluido amniótico ingerido, junto con algo de

secreción líquida de los pulmones, pasa al estómago y casi todo el agua se reabsorbe en el colon fetal, devolviéndose a la cavidad uterina a través de la orina. Hacia la semana 14 ya se observa claramente peristaltismo gástrico (Sase et al., 2005).

Al final del embarazo, el volumen diario de fluido amniótico que deglute el feto oscila entre 500 y 1000 ml, con ciclos de vaciado gástrico cada 80 minutos (El-Haddad et al., 2004; Mann et al., 1996). El feto, al tragar fluido amniótico, lo “limpia” de restos celulares, moco, lanugo, etc., acumulándose estos desechos en el intestino. Al finalizar la gestación, el intestino está lleno de meconio, que es el término médico empleado para referirse a las primeras heces del recién nacido y que suele expulsarse entre las primeras 12 y 48 h después del nacimiento (Clark, 1977).

En algunos casos (10-15%) el feto elimina el meconio incluso antes de nacer, tiñendo el fluido amniótico. Esto no representa ningún problema para el recién nacido a menos que sea inhalado durante el parto y pase a los pulmones causando inflamación de las vías respiratorias (Wiswell y Bent, 1993).

Una vez eliminado el meconio, las heces del niño con lactancia materna tienen un color amarillo, consistencia blanda-líquida y un olor suave característico. En cambio con lactancia artificial, las heces tienen un color algo más pálido, consistencia más dura y olor más desagradable.

### **II.7.2. Colonización del intestino infantil**

A la vista de las innumerables pruebas que confirman que la microbiota intestinal humana es un factor muy importante en la salud y bienestar de niños y adultos, muchos grupos de investigación han tratado de desvelar la complejidad de su composición y origen. Aunque el patrón de colonización parece ser muy específico del hospedador, se acepta que el intestino infantil contiene inicialmente bacterias anaerobias facultativas, como lactobacilos, estreptococos, enterococos y estafilococos, que crean un ambiente reductor favorable para el establecimiento posterior de bacterias anaerobias obligadas, como las especies de *Bacteroides*, *Clostridium* y *Bifidobacterium* (Mackie et al., 1999; Sakata et al., 1985).



La mayoría de los estudios sobre la microbiota del TGI se han realizado con muestras de heces. Sin embargo, algunos autores indican que existen diferencias importantes entre la comunidad bacteriana asociada a la mucosa del colon y la presente en las heces (Ouwehand et al., 2004; Zoetendal et al., 2002). En dos estudios recientes se demostraba mediante técnicas independientes de cultivo que la mucosa gastrointestinal contenía filotipos específicos que no estaban relacionados con ninguna bacteria conocida aislada de heces (Eckburg et al., 2005; Wang et al., 2005). Además la aplicación de este tipo de técnicas revela que la microbiota intestinal es significativamente más compleja que lo anticipado previamente, ya que sólo una fracción de las bacterias que viven en el intestino humano son cultivables (Suau et al., 1999).

La revisión de un gran número de estudios realizados sobre la colonización del intestino del neonato pone de manifiesto la dificultad de interpretar resultados y sacar conclusiones válidas. En muchas ocasiones debido a datos contradictorios, quizá por el uso de medios de cultivo en los que muchos microorganismos no pueden sobrevivir o que se consideran selectivos sin realizar comprobaciones taxonómicas posteriores. En este contexto, es indudable que las técnicas moleculares han aportado información muy valiosa, aunque no dejan de introducir sesgos importantes debido al aislamiento y/o amplificación preferencial del DNA de ciertas especies y a que las bases de datos sólo poseen información de un número limitado de microorganismos (Zoetendal et al., 2004). Por ello, para obtener una visión más exacta de las poblaciones bacterianas complejas quizá sea preferible combinar la información complementaria obtenida simultáneamente con medios de cultivo y con métodos moleculares (Harmsen et al., 2000; Kirjavainen et al., 2001). También es frecuente que se infravaloren algunas bacterias por su escaso interés o “glamour” comercial, a pesar de ser predominantes en la microbiota intestinal (Adlerberth et al., 2006). Precisamente algunos autores coinciden en hacer hincapié en que los lactobacilos y las bifidobacterias han recibido una atención desmesurada, probablemente impulsada por el gran éxito económico de los productos probióticos que los contienen, y distan mucho de ser poblaciones dominantes en el ecosistema intestinal (Palmer et al., 2007; Walter, 2008).

Tradicionalmente se ha aceptado que la colonización inicial del intestino empieza en el nacimiento y depende en gran medida de éste (parto o cesárea) y del tipo de alimentación (leche materna o preparado lácteo) e incluso del contacto íntimo que se establece entre madre e hijo. Esta idea se podría reconsiderar por la aparición de estudios recientes que han demostrado la presencia de bacterias en tejidos y muestras prenatales de individuos sanos



(Benno et al., 1984; Harmsen et al., 2000; Mackie et al., 1999; Tannock, 1994; Yoshioka et al., 1983). Otra idea preconcebida y ampliamente difundida, que algunos autores han empezado a cuestionar, es la importancia del tránsito a través de la vagina en la colonización inicial del intestino infantil. Es probable que, en el mejor de los casos, la microbiota vaginal tenga una mínima influencia y que posteriormente, a los pocos días, sea reemplazada por la microbiota de la leche materna (Matsumiya et al., 2002; Martín et al., 2007b).

En estos últimos años se ha puesto de manifiesto que la leche materna es una fuente constante de bacterias mutualistas o potencialmente probióticas para el intestino del lactante, con concentraciones relativamente elevadas ( $>10^4$  ufc/ml), siendo particularmente rica en estreptococos, estafilococos y bacterias lácticas (Beasley y Saris, 2004; Heikkilä y Saris, 2003; Kvist et al., 2008; Martín et al., 2003; Ng et al., 2004; Pérez et al., 2007). Probablemente no sea casual que las bacterias anaerobias facultativas que colonizan el TGI del neonato sean los grupos bacterianos más representativos de la microbiota de la leche materna (Martín et al., 2007a).

Cuando se inicia la fase de destete, se producen grandes cambios en la composición de la microbiota intestinal infantil, de tal manera que, en poco tiempo, desaparecen las diferencias observadas entre la microbiota de los niños alimentados con leche materna y la de los alimentados con fórmulas (Mackie et al., 1999; Stark y Lee, 1982). En general, se estima que los grupos microbianos dominantes en la microbiota intestinal de los niños mayores de 1 año comienzan a ser similares a los de los adultos, aunque todavía se aprecien diferencias en cuanto a las especies presentes (Favier et al., 2002; Palmer et al., 2007). Esto sería comparable a la relación en adultos entre el tipo de dieta y los distintos grupos microbianos, como indican algunos estudios en los que se compara la microbiota de comunidades occidentales y orientales (Benno et al., 1986; Hayashi et al., 2002). En cualquier caso, la microbiota del TGI humano es específica de cada individuo, como una huella dactilar y las poblaciones dominantes suelen permanecer estables a lo largo del tiempo (Franks et al., 1998; Moore y Moore, 1995; Simon y Gorbach, 1982; Zoetendal et al., 1998 y 2001).

## II.8. PROBLEMAS MICROBIOLÓGICOS DURANTE LA LACTANCIA: LA MASTITIS INFECCIOSA

### II.8.1. ¿Qué se entiende por mastitis?

Las mastitis consisten en una inflamación de uno o varios lóbulos de la glándula mamaria acompañada o no de infección (OMS, 2000). En general, el número de mastitis no infecciosas que pasan a ser un problema infeccioso suele ser tan elevado que algunos autores definen directamente “mastitis” como un proceso infeccioso de la glándula mamaria que se acompaña de diversos síntomas locales y sistémicos (Lawrence y Lawrence, 2005). En la práctica, se han considerado como factores predisponentes a una mastitis infecciosa diversos términos (a menudo confusos) relacionados con problemas de lactancia (“ingurgitación”, “obstrucción”, “retención”, “grietas”, “sobreinfección de grietas”, “pezones doloridos”, etc.) (Díaz, 2004). Sin embargo, dado que los agentes bacterianos implicados en mastitis lactacionales tienen capacidad *per se* para provocar obstrucción de conductos y/o grietas, parece evidente que no es que tales situaciones predispongan a un proceso infeccioso sino que, realmente, constituyen manifestaciones de una mastitis infecciosa.

La mastitis es más frecuente en la segunda y tercera semanas posparto (Creasy et al., 2004) y la mayoría de los estudios indican que entre el 75 y el 95% de los casos ocurren en las primeras doce semanas (Riordan y Nichols, 1990; Walker, 1999). Sin embargo, puede surgir en cualquier momento de la lactancia. La incidencia de esta enfermedad oscila entre el 3 y el 33% de las madres lactantes (OMS, 2000; Foxman et al., 2002). En España se estima en torno al 10% (Díaz, 2004), a pesar de carecer de datos epidemiológicos. Posiblemente, esta cifra sea mucho mayor según indican diversas asociaciones de lactancia españolas. En cualquier caso, se trata de una patología común entre las madres lactantes y que, con excesiva frecuencia, conduce a un abandono precoz e innecesario de la lactancia.

En los libros de texto se suele decir que las mastitis se manifiestan por dolor intenso y signos inflamatorios (enrojecimiento, tumefacción, induración) acompañados de síntomas generales similares a los de la gripe, que incluyen fiebre ( $>38,5^{\circ}\text{C}$ ), escalofríos, infartación de ganglios axilares, malestar general, cefaleas, náuseas y vómitos. Sin embargo, estas mastitis “de libro” sólo se observan en aproximadamente un 10-15% de las mujeres afectadas. En la mayoría de los casos, el único síntoma es un dolor intenso en forma de “pinchazos”

acompañado ocasionalmente de síntomas locales, como grietas y/o zonas de induración, pero sin afectación sistémica. Este hecho confunde frecuentemente el diagnóstico y provoca que se trate de un problema tan infravalorado como infradiagnosticado.

El dolor se debe a que las bacterias se disponen en forma de películas biológicas (*biofilms*) en el epitelio de los acinos y los conductos galactóforos. Si la concentración bacteriana rebasa los límites biológicos, la luz de los conductos se reduce, de tal manera que la presión que ejerce la leche sobre un epitelio que está inflamado es considerablemente mayor. En consecuencia, cuando se va acumulando la leche en los conductos o cuando se produce la eyección de la misma, se siente un dolor intenso en forma de “pinchazos”. En ocasiones, algunos de los conductos llegan a obturarse completamente, lo que provoca una retención de leche que empeora los síntomas locales (dolor, endurecimientos focales). Cuando la obturación se produce en alguno de los conductos que drenan al exterior en el pezón, se puede llegar a ver a simple vista, ya que la leche fluye por un número menor de poros que en condiciones normales. En ocasiones, estas obstrucciones forman unas estructuras características, integradas por calcio y bacterias, conocidas como “ampollas de leche”. Conviene recordar que el calcio es un elemento que fomenta la formación de *biofilms* y, obviamente, la presencia de este catión en leche es inevitable.

Las mastitis infecciosas pueden ser unilaterales o bilaterales y, en ambos casos, afectar a una o más unidades glandulares de cada pecho. Pero no es extraño que una mastitis unilateral derive en un problema bilateral. Los abscesos mamarios suelen tener su origen en la complicación de una mastitis infecciosa debido a un tratamiento tardío o inadecuado o a las características de la cepa bacteriana implicada; su incidencia oscila entre el 3 y el 11% en las mujeres con mastitis (Amir et al., 2004; Díaz, 2004). La mayor parte de los abscesos se localizan adyacentes al borde superior de la areola mamaria. El dolor suele ser más intenso que en las mastitis y los signos externos evidentes ya que la piel de la zona suele estar enrojecida, caliente y tumefacta, observándose en muchos casos una evidente deformación del pecho. En estos casos, también es frecuente la fiebre elevada.

### **II.8.2. Agentes etiológicos causantes de mastitis infecciosas**

A pesar de que la mayoría de las mastitis humanas tienen una etiología infecciosa, los estudios microbiológicos son muy escasos (Foxman et al., 2002). En otras especies de

mamíferos, los estudios etiológicos de mastitis son mucho más completos y complejos (Bradley, 2002; Zecconi et al., 2006).

Los principales agentes etiológicos de mastitis infecciosas pertenecen a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* (OMS, 2000). Los estafilococos son, con diferencia, las bacterias implicadas en un mayor porcentaje (>75%) de casos. Entre ellos, *Staphylococcus aureus* es la principal especie causante de las mastitis agudas (Thomsen et al., 1983; Riordan y Nichols, 1990; Stafford et al., 2008). Este tipo de mastitis (“de libro”) cursan con una sintomatología muy evidente, tanto al nivel local como al sistémico (suelen ir acompañadas de fiebre alta), y que si no se tratan adecuadamente, pueden derivar en la formación de abscesos.

Sin embargo, existen datos recientes que apuntan a los estafilococos coagulasa-negativos, especialmente *S. epidermidis*, como la primera causa de mastitis humanas en términos cuantitativos (Bakhshandeh-Nosrat et al., 2007). Este hecho se había observado reiteradamente en mastitis bovinas, ovinas y caprinas (Soltys y Quinn, 1999; Zhang y Maddox, 2000; dos Santos Nascimento et al., 2005; Thorberg et al., 2006). De hecho, se ha sugerido que las cepas de *S. epidermidis* que causan mastitis en vacas tienen origen humano (Thorberg et al., 2006), ya que esta especie está ausente o es muy rara en la piel o mucosas bovinas (Watts y Owen, 1989; White et al., 1989).

El análisis del genoma completo de algunas cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* de origen humano concuerda con su implicación en los distintos cuadros de mastitis (Gill et al., 2005). La primera especie está especialmente capacitada para causar infecciones agudas, mientras que las propiedades de la segunda están más vinculadas con infecciones crónicas, insidiosas y/o recurrentes. Probablemente, *S. epidermidis* requiere un hospedador predispuesto para transformarse de habitante comensal del cuerpo humano en agente infeccioso (Vuong y Otto, 2002). Este hecho explicaría por qué la leche humana contiene una serie de bacterias que únicamente causan mastitis en una minoría de mujeres que, además, suelen sufrir el mismo problema cuando tienen más de un hijo. Los factores que predisponen a padecer esta infección se tratarán con más detalle posteriormente.

Las cepas de estafilococos implicadas en mastitis suelen compartir diversas propiedades: capacidad para formar *biofilms* en los epitelios, resistencia a la meticilina

(*mecA*<sup>+</sup>) y a otros antibióticos de relevancia clínica, y mecanismos de evasión de la respuesta del sistema inmunitario (Vandecasteele et al., 2003; Melchior et al., 2006; Oliveira et al., 2006). Además, las cepas de *S. aureus* aisladas en mastitis bovinas son capaces de producir superantígenos (SAGs) (Smyth et al., 2005; Larsen et al., 2002; Hu et al., 2008), un mecanismo que permite evitar la respuesta del sistema inmunitario (Llewelyn y Cohen, 2002; Alouf y Müller-Alouf, 2003). Los SAGs son exotoxinas que exhiben una elevada capacidad mitogénica sobre los linfocitos T. En comparación con una respuesta inducida por un antígeno normal, en la que únicamente se activan un 0,001-0,0001% de los linfocitos T (aquellos con alta especificidad frente a ese antígeno), los SAGs son capaces de activar hasta un 20-25% de los linfocitos T de un organismo de una forma inespecífica. Este hecho provoca una respuesta inmunitaria tan masiva como ineficaz. A su vez, tal activación produce una liberación masiva de diversas citoquinas, que se traduce en una serie de síntomas clínicos como la fiebre, escalofríos, náuseas, etc. Probablemente, esto explique la dificultad de lograr una curación definitiva en un pequeño porcentaje (5-7%) de mastitis infecciosas bien diagnosticadas.

El segundo grupo bacteriano implicado en estos procesos infecciosos es el de los estreptococos, ya que o bien solos o en compañía de los estafilococos, se encuentran en un 10-15% de los cuadros de mastitis. En algunos textos se indica que las especies estreptocócicas que se aíslan con más frecuencia en casos humanos son *Streptococcus agalactiae* (Rench y Baker, 1989), *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*, como sucede también en las mastitis bovinas (Bradley, 2002). Sin embargo, la presencia de tales especies en mastitis humanas es muy rara y, por el contrario, es más frecuente la de otras especies, como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e, incluso, *Streptococcus pneumoniae* (Wüst et al., 1995).

Más infrecuente (<3%) es la implicación de las corinebacterias o de diversas enterobacterias, como *E. coli*, *K. pneumoniae* o *Enterobacter* spp. Excepcionalmente, se han identificado especies como *Salmonella typhi* o *Salmonella paratyphi*, pero estos casos no tuvieron lugar durante la lactancia (Edelstein, 1993; Kushwaha et al., 2002). *Mycobacterium tuberculosis* es otra causa rara de mastitis (Maroulis et al., 2008). Algunas especies de levaduras, *Candida albicans* en particular, también pueden ser causa de mastitis pero su incidencia es muy baja (<0,5%).

Los principales agentes etiológicos de abscesos son prácticamente los mismos que los causantes de mastitis: *S. aureus* es la principal especie implicada, seguido muy de cerca por *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa-negativos. Resulta revelador que más del 50% de las cepas de *S. aureus* causantes de abscesos sean resistentes a la meticilina (Moazzez et al., 2007).

En ocasiones una mastitis infecciosa se ha confundido con el síndrome de Raynaud, descrito originalmente como un vasoespasmo de las arteriolas de las partes terminales del cuerpo (dedos, orejas o nariz) que causa una isquemia intermitente. Se manifiesta como cambio en la coloración del pezón, dolor intenso, sensación de quemazón y parestesia (Anderson et al., 2004; Page et al., 2006; Morino y Winn, 2007). En estos casos el tratamiento con agentes antimicrobianos es improcedente (Morino y Winn, 2007).

### II.8.3. Factores predisponentes

De los diversos factores que pueden favorecer el desarrollo de una mastitis infecciosa (OMS, 2000), hay dos que destacan por su importancia: (1) la respuesta del sistema inmunitario del hospedador y su interacción con la cepa bacteriana que causa la infección; y (2) la administración de antibióticos sin una base racional.

Para el sistema inmunitario, el control de las infecciones intramamarias resulta bastante más complicado que el de otro tipo de infecciones. Por una parte, la leche tiene un efecto diluyente sobre los factores inmunitarios reclutados por el tejido mamario. Y, por otra, la grasa y las caseínas ejercen un efecto bloqueante sobre estos mismos factores. Para evitar tales efectos, el suministro de efectores inmunitarios a la glándula mamaria debe ser continuo y en una cantidad mucho más elevada que la necesaria para la protección de otros tejidos u órganos (Burton y Erskine, 2003). Algunas de las bacterias causantes de mastitis pueden doblar su población cada 30-40 minutos por lo que se requiere un reclutamiento muy rápido de neutrófilos sanguíneos y anticuerpos opsonizantes (especialmente de la subclase IgG<sub>2</sub>) durante las primeras 12-18 h post-infección para prevenir o minimizar los síntomas locales y sistémicos de infección (Leitner et al., 2000). En tales casos, el tráfico de neutrófilos circulantes hacia el tejido extravascular es tan rápido que la vida media de estos leucocitos en la sangre es de sólo 4-10 h (Smith, 1994). La población de linfocitos y macrófagos residentes

en la glándula mamaria juega un papel muy importante en el mantenimiento del citado sistema.

Algunas cepas podrían tener otro mecanismo para evadir una respuesta inmunitaria normal: mimetizarse con el hospedador. Esto se consigue “copiando” ciertas secuencias que forman parte de los antígenos del hospedador y, más concretamente, de los HLA (Ebringer y Wilson, 2000). Esta hipótesis tendrá que ser confirmada en el futuro, pero ya se han descrito relaciones entre infecciones estafilocócicas y estreptocócicas con ciertos HLAs (Giordano et al., 1996; Nooh et al., 2007; Thibodeau et al., 1994).

El segundo factor predisponente es el uso indiscriminado de antibióticos durante el último tercio del embarazo, el parto y/o la lactancia. Un pequeño porcentaje de las bacterias que colonizan la glándula mamaria durante el último tercio del embarazo poseen genes de resistencia a antibióticos, especialmente frente a beta-lactámicos. Al aplicar el antibiótico, se genera una disbiosis de la microbiota mamaria, porque desaparecen las bacterias sensibles pero se seleccionan las resistentes, que crecen sin competencia y alcanzan concentraciones muy superiores a las normales, conduciendo a una mastitis infecciosa. El número de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina aisladas de casos de mastitis ha aumentado espectacularmente en los últimos años (Reddy et al., 2007). Paralelamente, se ha observado un notable aumento del porcentaje de mastitis asociadas a antibioterapia, con una presentación más precoz que las mastitis infecciosas “tradicionales”: los primeros síntomas pueden aparecer incluso entre el primer y el séptimo día posparto. Es posible que una de las principales causas de este aumento sea un uso inadecuado del protocolo para la prevención de las sepsis neonatales causadas por estreptococos del grupo B (EGB).

Los EGB constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad perinatal y, por ello, se toma una muestra de exudado vaginal entre las semanas 35-37 de embarazo que se cultiva para detectar la presencia de estas bacterias. En caso positivo, se administra un antibiótico (habitualmente penicilina G) por vía intravenosa durante el parto. Este protocolo ha sido eficaz para reducir la tasa de sepsis, desde 1,2-1,8 hasta 0,4-0,8 casos por mil neonatos (Puopolo et al., 2005). Sin embargo, la aplicación de esta profilaxis de forma indiscriminada está siendo objeto de una revisión crítica (Russell y Steer, 2008). Los EGB forman parte de la microbiota fisiológica del tracto intestinal y/o vaginal de entre un 4 y un 40% de las mujeres (Anthony et al., 1978; Dillon et al., 1982; Regan et al., 1991). A pesar de

que la tasa de transmisión de madres a niños puede ser de hasta un 75%, sólo el 1-2% de los niños nacidos de mujeres EGB-positivas (que no reciben profilaxis) desarrollan sepsis (Baker y Edwards, 1995). Por este motivo, la AAP recomienda que el tratamiento antibiótico se administre únicamente en mujeres EGB-positivas que presenten ciertos factores de riesgo adicionales: parto prematuro (<37 semanas), rotura prematura o prolongada (>18 h) de membranas, fiebre intraparto superior a 38°C, bacteriuria por EGB y/o haber tenido previamente un hijo que desarrolló una sepsis por EGB. Por otra parte, resulta evidente que el tratamiento de mujeres EGB-positivas ha conducido a una reducción notable de la tasa de sepsis por estas bacterias pero no a su desaparición. En este sentido, se está observando un preocupante incremento en las poblaciones de EGB resistentes a la penicilina G, en particular, y a los beta-lactámicos, en general (Chu et al., 2007; Dahesh et al., 2008).

#### **II.8.4. Impacto de las mastitis infecciosas en el lactante**

Un importante aspecto a considerar en las mastitis infecciosas es si el mantenimiento de la lactancia podría afectar negativamente al lactante. Desde el punto de vista microbiológico, aunque la leche está aportando una concentración mayor de lo normal de ciertas bacterias, la estructura y la fisiología del intestino del lactante son muy diferentes a las de la glándula mamaria. La luz intestinal es muchísimo mayor que la de los acinos y conductos galactóforos, por lo que la producción de *biofilms* no supondría ningún problema para el tránsito intestinal. Además, a los pocos días de vida, el intestino infantil ya contiene una concentración de bacterias considerablemente más elevada que la que existe en la leche de una mujer con mastitis; en ese ambiente tan competitivo, el impacto de un exceso de estafilococos y estreptococos es insignificante. Quizás el único problema para el lactante provenga del hecho de que en un pequeño porcentaje de casos coexisten una mastitis estafilocócica en la madre y una candidiasis oral en su hijo. Esto se debe a la relación sinérgica que los estafilococos pueden establecer con las levaduras (Adam et al., 2002) que existen de forma natural, aunque en una pequeña concentración, en la cavidad oral. Desde el punto de vista nutricional, no existe ningún dato que demuestre que la composición bioquímica de la leche mastítica es inferior a la de la leche fisiológica.



## II.9. PROBIÓTICOS PARA EL BINOMIO MADRE-HIJO

Según la “teoría de la higiene”, ya comentada en el Capítulo 6, los niños que disfrutaban de ambientes con un elevado nivel de higiene no están sometidos a la presión que ejerce la estimulación microbiana mediante las enfermedades infecciosas. Este hecho modifica la composición de la microbiota intestinal y, por tanto, la modulación del sistema inmunitario neonatal (Adlerberth et al., 2006; Rautava et al., 2004). En este sentido, el diseño de probióticos específicamente dirigidos a la población infantil ha despertado un gran interés en los sectores médico e industrial ya que, por una parte, podrían facilitar la creación de una barrera segura y eficaz frente a microorganismos patógenos y, por otra, supondrían un importante estímulo para la maduración del GALT. En 2004, el Comité de Nutrición de la ESPGHAN reconoció que existen evidencias concluyentes sobre el efecto beneficioso que algunos probióticos ejercen sobre la salud infantil, por lo que recomendó intensificar los esfuerzos para evaluar la eficacia de bacterias probióticas (Agostoni et al., 2004). Anteriormente, la FAO y la OMS ya habían reconocido la utilidad de ciertas cepas en pacientes que sufrían o tenían riesgo de sufrir diarreas agudas (FAO/WHO, 2001).

### II.9.1. Gastroenteritis infecciosa aguda

Las gastroenteritis agudas constituyen una de las enfermedades infecciosas más frecuentes en niños y conllevan un importante número de ingresos hospitalarios. La situación es particularmente grave en los países en vías de desarrollo, donde son una de las principales causas de mortalidad infantil. En los países desarrollados, por otra parte, continúa siendo una de las primeras causas de morbilidad infantil y de demanda de atención tanto en los centros de atención primaria como en los servicios de urgencias.

Los probióticos representan una alternativa prometedora en el tratamiento y la prevención de las gastroenteritis infecciosas agudas, ya que parecen particularmente eficaces en el tratamiento de las gastroenteritis ocasionadas por rotavirus (Colbère-Garapin et al., 2007; Guandalini, 2008; Saavedra, 2007).

## II.9.2. Diarreas asociadas a antibioterapia

El uso de antibióticos altera en algunas ocasiones la composición normal de la microbiota intestinal y conduce a una situación de disbiosis, produciéndose una infección por patógenos oportunistas. La manifestación más típica es la aparición de diarrea causada por *Clostridium difficile*, aunque ocasionalmente puede deberse a otros microorganismos (*Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *S. aureus* o *Klebsiella* spp.) (Beaugerie y Petit, 2004; Marteau et al., 2001; Parracho et al., 2007). Se estima que alrededor de un tercio de los niños que reciben antibióticos de amplio espectro (particularmente aminopenicilinas, cefalosporinas y clindamicina) desarrollan un cuadro diarreico que puede oscilar desde una diarrea leve hasta una colitis pseudomembranosa grave (de Vrese y Schrezenmeir, 2008; Tojo y Leis, 2003). En tales circunstancias, el empleo de probióticos se ha convertido en una alternativa eficaz para evitar o minimizar el efecto de los antibióticos sobre la microbiota intestinal.

Diversos estudios realizados en niños tratados con antibióticos orales han mostrado la eficacia de *Lactobacillus rhamnosus* GG, solo o junto con *Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacterium lactis* junto con *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Bifidobacterium infantis* para disminuir la incidencia, duración y severidad de la diarrea causada por antibioterapia (Arvola et al., 1999; Buts et al., 1993; Correa et al., 2005; Jirapinyo et al., 2002; Kotowska, 2005; Tankanow et al., 1990; Vanderhoof et al., 1999). A pesar de todos los estudios realizados, un metaanálisis reciente sobre la eficacia y efectos adversos de la administración de probióticos para prevenir este tipo de afecciones, subraya la necesidad de confirmar el efecto de los microorganismos y las dosis más prometedoras (*Lb. rhamnosus* GG, *Lactobacillus sporogenes* y *S. boulardii*, con dosis de 0,5 a  $4 \times 10^8$  ufc/día) (Johnston et al., 2007).

## II.9.3. Enfermedades alérgicas

En las últimas décadas, la incidencia y morbilidad de los trastornos alérgicos han aumentado drásticamente, de tal manera que se han convertido en las enfermedades crónicas más comunes durante la infancia en los países desarrollados. El síndrome dermatitis-eczema representa frecuentemente la primera manifestación de la enfermedad atópica infantil. El gran malestar físico que suele conllevar este síndrome repercute negativamente en la calidad de

vida de toda la familia. Ante la necesidad de nuevas estrategias para tratar de reducir su impacto sanitario y social, en los últimos años se ha explorado la posibilidad de emplear probióticos como una opción terapéutica para la enfermedad atópica. Se ha especulado que la exposición a ciertos agentes bacterianos en las primeras etapas de la vida puede jugar un papel importante en la maduración de las respuestas de tipo Th1 y en la inhibición del desarrollo de respuestas alérgicas de tipo Th2 y de la producción de inmunoglobulina E (IgE) (Neaville et al., 2003).

Hasta la fecha se han realizado numerosos estudios preliminares con resultados positivos para evaluar la utilidad de los probióticos en el tratamiento de la enfermedad atópica en niños (Arvola et al., 2002; Kalliomaki et al., 2001, 2003 y 2007; Kukkonen et al., 2007; Wickens et al., 2008). Aunque algunos estudios parecen prometedores, quedan por dilucidar muchos aspectos clave que permitan recomendar el uso generalizado de probióticos para el tratamiento de este tipo de enfermedades. De hecho, en algunos ensayos se ha constatado que esta estrategia conlleva un cierto riesgo de efectos adversos, como infecciones e isquemia intestinal (Boyle et al., 2009).

Una de las recomendaciones más frecuentes para prevenir las alergias en niños con antecedentes familiares es la lactancia materna exclusiva durante los 4-6 primeros meses. Entre los posibles mecanismos que explican el efecto protector de la lactancia materna se incluye una menor exposición a antígenos, la protección frente a infecciones y un desarrollo adecuado de la microbiota intestinal y del sistema inmunitario (van Odijk et al., 2003; Thygarajan y Burks, 2008). Sin embargo, los resultados de un estudio reciente sugerían que este efecto protector sólo era patente hasta que los niños tienen 7 años (Matheson et al., 2007).

El hecho de que el desarrollo de enfermedad atópica esté precedido de alteraciones en la composición de la microbiota intestinal (Björkstén et al., 2001; Kalliomäki et al., 2001), sugirió que esta enfermedad se podría prevenir con un control temprano de la microbiota intestinal. Los ensayos clínicos realizados con madres de niños de alto riesgo a las que se les administraba un probiótico (*Lb. rhamnosus* GG) durante el embarazo y la lactancia demostraron que, efectivamente, el probiótico reducía significativamente la prevalencia de eczema atópico hasta los 4 años de edad (Kalliomäki et al., 2001; Kalliomäki et al., 2003). Todavía es pronto para comprobar el efecto a largo plazo en estos ensayos.

En un alto porcentaje de casos, las enfermedades atópicas están asociadas con las hipersensibilidades alimentarias (Sicherer y Sampson, 1999). Por ello, no es de extrañar que algunos probióticos también sean útiles para mejorar el curso clínico de la alergia a leche de vaca, otro problema en el que existe un fracaso en los mecanismos de tolerancia oral. Se han postulado diversos mecanismos por los que los lactobacilos podrían reducir la sintomatología, entre los que destacan su actividad proteolítica, la reducción de los receptores en los neutrófilos o el aumento de la secreción de IFN- $\gamma$  (Pohjavuori et al., 2004). No obstante, hasta la fecha no se ha observado ningún efecto preventivo de los probióticos en este tipo de trastornos inmunitarios (Osborn y Sinn, 2007).

#### **II.9.4. Probióticos y prematuros**

La supervivencia de los prematuros, definidos como aquellos que han nacido con menos de 37 semanas de gestación, está condicionada por su susceptibilidad a múltiples problemas. La inmadurez de su sistema inmunitario, la mayor permeabilidad intestinal que favorece la translocación bacteriana, los frecuentes tratamientos profilácticos con antibióticos y el ambiente de las unidades de cuidados intensivos neonatales predispone a los prematuros a sufrir infecciones nosocomiales, con frecuencia por bacterias con multirresistencias a antibióticos. En tales circunstancias, los probióticos podrían contribuir a reducir la mortalidad y morbilidad mediante la inhibición de la proliferación de bacterias patógenas. Debe destacarse que la microbiota intestinal de los prematuros difiere de la de los niños a término (Mohan et al., 2006; Schwartz et al., 2003) y depende del tipo de alimentación (Gewold et al., 1999). Los estudios de administración de cepas probióticas a prematuros son relativamente escasos y se han ceñido a la rastreabilidad de las bacterias suministradas y/o a su papel en la prevención de la enterocolitis necrotizante y de diversas infecciones (Mohan et al., 2008).

La enterocolitis necrotizante es una enfermedad que afecta fundamentalmente a prematuros de bajo peso y que se caracteriza por procesos de ulceración y necrosis intestinal (Deshpande et al., 2007). La tasa de mortalidad es elevada y puede alcanzar hasta al 35% de los niños afectados. Además de la prematuridad, existen al menos otros tres factores esenciales para su desarrollo: (1) situación de isquemia e hipoxia intestinal, (2) alimentación con fórmula y (3) una microbiota intestinal aberrante, en la que predominan bacterias propias del ámbito hospitalario que tienen potencial como patógenos en estos hospedadores sensibles

(Deshpande et al., 2007). Esta última circunstancia ha llevado a pensar que los probióticos podrían contribuir al tratamiento y/o prevención de esta enfermedad. En general, la incidencia de enterocolitis necrotizante y septicemia es menor en prematuros a los que se les administra un probiótico (Bin Nun et al., 2005; Hoyos, 1999; Lin et al., 2005 y 2008). Las cepas empleadas hasta la fecha (*B. infantis*, *Bifidobacterium bifidus*, *St. thermophilus* y *Lb. acidophilus*) han mostrado ser seguras en estos hospedadores y su uso no ha tenido consecuencias negativas. Las bacterias presentes de forma natural en la leche humana pueden constituir una alternativa muy interesante a las cepas utilizadas hasta la fecha y podrían explicar, al menos parcialmente, porqué la incidencia de esta enfermedad es muy baja en los prematuros de bajo peso alimentados con leche materna (Lucas y Cole, 1990; Schanler et al., 1999; Sisk et al., 2007).

El síndrome de intestino corto deriva de la pérdida anatómica o funcional de un tramo importante del intestino delgado y, por lo tanto, de la superficie de absorción, dando lugar a un cuadro de malabsorción de vitaminas, minerales y oligoelementos junto con una alteración del equilibrio hidroelectrolítico del organismo. En Pediatría, la mayoría de los casos de síndrome de intestino corto también se observan en el período neonatal. Los niños con este síndrome presentan una escasa motilidad intestinal y una dilatación de diversos segmentos intestinales, lo que suele derivar en un sobrecrecimiento bacteriano. Este hecho acelera el estado de malabsorción debido a la inflamación de la pared intestinal y a la desconjugación de los ácidos biliares. Los síntomas asociados incluyen desde acúmulo de gases hasta diarrea grave con heces particularmente malolientes, pasando por aquellos asociados a la acidosis metabólica derivada del acúmulo de ácido D-láctico en la sangre (Bongaerts et al., 2000; Soler Palacín et al., 2006).

Precisamente esta última circunstancia ha condicionado el empleo de probióticos en alimentos infantiles. El RD 142/2002, que incorporó la Directiva 2001/5/CE de la Unión Europea que regula el empleo de bacterias en fórmulas infantiles y de continuación dirigidas a niños sanos y en alimentos infantiles con fines médicos específicos, indica que sólo se pueden utilizar bacterias no patógenas productoras del isómero L(+) del ácido láctico (BOE, 2002). La exclusión de las bacterias productoras de D-lactato deriva de una recomendación del CODEX de 1976 basada en estudios cuestionables, por lo que expertos de la Unión Europea han aconsejado que se evalúen las cepas de forma individualizada, teniendo en cuenta los datos disponibles sobre su seguridad y eficacia. De hecho, curiosamente, en niños con

síndrome de intestino corto se ha demostrado que la administración de *Lactobacillus reuteri*, productor de D-lactato, conduce a una remisión de la sintomatología más rápida que con cepas probióticas que sólo producen L-lactato (Connolly y Lönnerdal, 2004). Por otra parte, *Lactobacillus johnsonii* La1, que produce más D-lactato que L-lactato, se encuentra en leches fermentadas comercializadas en todo el mundo sin que, hasta la fecha, se hayan registrado efectos negativos asociados a su consumo por la población infantil. Lo mismo sucede en el caso de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, presente en los cultivos iniciadores del yogur y que produce exclusivamente el isómero D del ácido láctico. Finalmente, el hecho de que muchas bacterias lácticas aisladas de leche humana sean productoras de D-lactato (Martín et al., 2005) debería ser un argumento con suficiente peso como para permitir su inclusión en alimentos infantiles.

Para prematuros de cualquier edad gestacional, de cualquier peso y con cualquier tipo de enfermedad, se aconseja (siempre que sea posible) el método de la madre canguro (MMC) (Ludington-Hoe et al., 1993; Cattaneo et al., 1998; Whitelaw y Sleath, 1993). Este método se puede definir como el contacto piel con piel entre madre y recién nacido prematuro lo más precoz, continuo y prolongado posible, incluyendo la lactancia materna. Fue desarrollado en 1979 por los Drs. Rey y Martínez, del Hospital de S. Juan de Dios de Bogotá (Colombia), como una alternativa eficaz a la escasez de recursos materiales (Charpak et al., 1994). Entre las numerosas ventajas del MMC sobre el método tradicional (incubadora), cabe destacar una mayor supervivencia y un menor riesgo de infecciones (incluidas las nosocomiales). Precisamente, la leche de la propia madre es el alimento mejor tolerado por el prematuro porque su composición está totalmente adaptada para satisfacer las necesidades correspondientes a la edad gestacional del neonato. Por este motivo, no es de extrañar que los prematuros alimentados con leche de su propia madre tengan una microbiota diferente de la que suelen tener los alimentados con fórmulas infantiles (Blakey et al., 1982). De hecho, esta última forma de alimentación suele conducir a microbiotas aberrantes donde predominan las cepas propias de la UCI neonatal, con todo el peligro que ello representa (Hufnagel et al., 2007). En consecuencia, la incorporación de bacterias características de la leche humana a las fórmulas infantiles podría ser una buena alternativa para prevenir infecciones en aquellos prematuros que, desafortunadamente, no puedan tener acceso al MMC.

## II.9.5. Probióticos para mujeres embarazadas y lactantes

La administración de probióticos a mujeres embarazadas y lactantes podría ser de particular interés no sólo por el efecto beneficioso directo para la madre al modular su microbiota (digestiva, mamaria y urogenital), sino también por el impacto que pueda tener sobre la salud del niño. En distintas especies animales se ha puesto de manifiesto que la manipulación de la microbiota materna mediante la administración de probióticos durante el embarazo y la lactancia influye favorablemente en diversos aspectos de su descendencia (maduración y función del intestino, protección inmunológica, reducción de la incidencia de diarreas, etc.) (Fåk et al., 2008b; Fukushima et al., 1999; Greco, 2008). En humanos, por ejemplo, se ha comprobado que esta estrategia es un modo seguro de aumentar el potencial inmunoprotector de la leche materna y prevenir algunas enfermedades, como el eczema atópico (Rautava et al., 2002).

La administración de probióticos a mujeres gestantes y lactantes facilitaría, en primer lugar, que adquirieran una microbiota digestiva adecuada. Cada vez es más evidente que la composición microbiana del intestino materno ejerce una influencia directa sobre las bacterias que aparecen en la leche materna (Martín et al., 2003). En consecuencia, la administración de probióticos a embarazadas y lactantes podría influir en el tipo de bacterias que ingieren los niños que reciben lactancia materna y, por lo tanto, en el desarrollo de su microbiota intestinal. Los estudios realizados hasta la fecha son muy prometedores (Grönlund et al., 2007; Kukkonen et al., 2007; Pérez et al., 2007; Wickens et al., 2008).

También tienen interés los probióticos dirigidos a modular la microbiota vaginal de la madre, que en mujeres sanas puede incluir bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, micoplasmas y levaduras (Martín et al., 2008b). En general, dominan los lactobacilos (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus jensenii*) que regulan la microbiota vaginal mediante la producción de compuestos antimicrobianos (como ácido láctico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y bacteriocinas) y/o mediante la competencia por los nutrientes o por los lugares de unión a las células del epitelio vaginal (Barrons y Tassone, 2008; Donders, 2007). Existe una íntima relación entre la presencia de cepas de lactobacilos productores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una menor incidencia de candidiasis, gonorrea, vaginosis bacteriana e infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Martín et al., 2008b). De hecho, la pérdida de lactobacilos en la mucosa vaginal de mujeres embarazadas puede conducir a una vaginosis bacteriana y

aumentar el riesgo de parto prematuro (Donders, 2007). El uso de ciertos lactobacilos (*Lb. acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lb. reuteri* y *Lb. rhamnosus*) es un recurso eficaz para restaurar la microbiota normal de la vagina cuando existen infecciones del tracto genitourinario, tanto mediante aplicación tópica en vagina como por vía oral (Falagas et al., 2008; Kontiokari et al., 2001; Nyirjesy et al., 1997; Reid et al., 2001; Reid, 2002). Por otra parte, los lactobacilos podrían jugar un papel importante en la prevención de la colonización vaginal por parte de los EGB que, como ya se ha comentado, pueden causar enfermedades graves e incluso la muerte en recién nacidos (Weisman et al., 1992).



### **III. AISLAMIENTO DE BACTERIAS COMENSALES DE CORDONES UMBILICALES PROCEDENTES DE RECIÉN NACIDOS SANOS MEDIANTE CESÁREA**

**Artículo publicado en *Current Microbiology***



## Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section

Esther Jiménez,<sup>1</sup> Leonides Fernández,<sup>1</sup> María L. Marín,<sup>1</sup> Rocío Martín,<sup>1</sup> Juan M. Odriozola,<sup>2</sup> Carmen Nueno-Palop,<sup>3</sup> Arjan Narbad,<sup>3</sup> Mónica Olivares,<sup>4</sup> Jordi Xaus,<sup>4</sup> Juan M. Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Obstetricia, Hospital Universitario Doce de Octubre, 28041 Madrid, Spain

<sup>3</sup>Food Safety Science Division, Institute of Food Research, Norwich NR4 7UA, UK

<sup>4</sup>Department of Immunology, Puleva Biotech, 18004 Granada, Spain

Received: 21 February 2005 / Accepted: 17 May 2005

**Abstract.** In a previous study, lactic acid bacteria were isolated from meconium obtained from healthy neonates born by cesarean section. Such a finding suggested that term fetuses are not completely sterile, and that a mother-to-child efflux of commensal bacteria may exist. Therefore, presence of such bacteria in umbilical cord blood of healthy neonates born by elective cesarean section was investigated. The blood samples were submitted to an enrichment step and then inoculated onto agar plates. All the identified isolates belonged to the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, or *Propionibacterium*. Later, a group of pregnant mice were orally inoculated with a genetically labeled *E. faecium* strain previously isolated from breast milk of a healthy woman. The labeled strain could be isolated and polymerase chain reaction detected from the amniotic fluid of the inoculated animals. In contrast, it could not be detected in the samples obtained from a noninoculated control group.

Since the old studies of Tissier [23] concerning the acquisition of the infant gut microbiota, the idea that fetuses are sterile in utero and that bacterial colonization of the newborn intestinal tract starts during the transit through the labor channel, due to cross-contamination with vaginal and fecal bacteria of the maternal microflora, has been widely accepted [16, 22]. However, recent studies have questioned the importance of the transit through the vagina, which would have, if any, a minor role in the bacterial colonization of the newborn [17, 19].

A molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infant by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) showed that only approximately one fourth of the infants acquired vaginal lactobacilli from their mothers at birth, and that, in such cases, they do not colonize the infant intestine because

they are replaced by lactobacilli associated with human milk [19]. In fact, human milk is a major factor in the initiation and development of neonatal gut microflora because this substrate represents a continuous source of commensal bacteria to the infant gut during several weeks after birth [17]. It is estimated that an infant consuming approximately 800 mL will ingest about  $1 \times 10^5$ – $1 \times 10^7$  commensal bacteria while suckling and, therefore, it is not surprising that the bacterial composition of the infant fecal flora reflects that of breast milk and not the vaginal one [10].

In relation to the presumptive sterility of in utero fetuses, our group has isolated lactic acid bacteria and other commensal bacteria from meconium obtained from healthy neonates born either by labor or cesarean section [18]. Such finding suggested that, at least, term fetuses are not completely sterile and that a mother-to-child efflux of commensal bacteria through the placenta barrier may exist. To elucidate this question, the presence of such bacteria in the umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section was investi-

gated in this study. Later, pregnant mice were orally inoculated with a genetically labeled *Enterococcus faecium* strain previously isolated from breast milk of a healthy woman and samples of amniotic fluid obtained by cesarean section were investigated for the presence of the labeled strain.

## Materials and Methods

**Source and isolation of bacterial isolates.** The samples were aseptically collected during programmed elective cesarean performed in the Servicio de Obstetricia, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid (Spain). An umbilical cord fragment of approximately 5 cm was clumped, and the blood contained in the umbilical vessels was immediately extracted with a sterile syringe in a class II safety cabinet (mod. HERAsafe, Heraeus, Hanau, Germany). Informed consent was obtained from the 20 healthy mothers that provided the biological samples used in this study. Ethical clearance for the study was obtained from the Ethical Committee in Human Clinical Research (Hospital Clínico, Madrid, Spain).

Initially, the blood samples (10 µL) were submitted to an enrichment step in brain and heart infusion broth (BHI; Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with resazurin (4 mL/L) and L-cysteine (0.5 g/L). The 25-mL broth cultures were incubated in duplicate at 37°C for 24 h anaerobically (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in a MACS-MG-1000 anaerobic workstation (DW Scientific, Shipley, UK). Non-inoculated tubes containing BHI broth from the same medium batch were also incubated and used as negative controls for bacterial growth. Both inoculated and non-inoculated broth cultures were subcultured on BHI plates that were pre-reduced by placing in the anaerobic cabinet at least 16 h before inoculation. The incubation conditions were identical to those described for the broth cultures. The isolates were examined by phase-contrast microscopy to determine cell morphology and Gram-staining reaction. Subsequently, a percentage of the isolates, representative of all the colony and cell morphologies observed, was submitted to 16S rDNA sequencing. DNA was isolated from 3 mL of overnight BHI cultures using the DNeasy tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The DNA was used in subsequent PCR amplifications that were carried out in DNA Thermal Cyclers (Techne, Cambridge, UK). PCR amplifications were performed using primers plb16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and mlb16 (5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3'), and the following program: [(96°C for 4 min) × 1 cycle] + [(96°C for 30 s; 48°C for 30 s; 72°C for 45 s) × 30 cycles] + [(72°C for 4 min) × 1 cycle]. The primers, based on conserved regions of the 16S rRNA gene, were previously designed by Kullen et al. [15], and used to direct PCR amplification of an approximately 500 bp portion of such gene. Five microliters of the PCR mixtures were analyzed on a 1.2% (w/v) agarose (Sigma, St. Louis, MO, USA) gel with ethidium bromide staining. A 100-bp ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a molecular weight standard. The PCR products were cleaned using Wizard PCR Preps DNA purification System (Promega, Southampton, UK), and 5 ng of the PCR product was used as a template for subsequent DNA sequencing reactions with plb16 and mlb16 primers. DNA sequencing was carried using an Applied Biosystems DNA sequencer (model 373A) and the manufacturer's ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The partial 16S RNA gene sequences of bacterial strains identified in this study have been deposited in the EMBL nucleotide sequence database under accession numbers AJ968563 to AJ968646.

**Oral administration of a labeled *E. faecium* strain to pregnant mice.** *E. faecium* HA1, a breast milk isolate [17], was selected to investigate the potential mother-to-child transfer of commensal bacteria through the placental barrier in a murine model. Because labeled *E. faecium* cells were required, a genetic label previously developed by our group was used [9]. Briefly, a 189-bp PCR fragment comprising the junction between the 35S rRNA promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV) and the EPSPS gene of *Agrobacterium tumefaciens* was amplified from transgenic soy kindly provided by Biotools (B&M Labs, Madrid, Spain) using the primers EPSP1 (5'-CGCGGATCCTGTATGTATATCTCCACTGACG-3') and EPSP2 (5'-CGCGGATCCTGTATCCCTTGAGCCATGTTGT3') and the conditions previously described [9]. Primers were designed with *Bam*HI sites in their 5'-tails (underlined sequences) to facilitate the cloning of the fragment in the shuttle vector pTG262, which contains a gene conferring resistance to chloramphenicol (Cm) [7]. The resulting plasmid was introduced by electroporation (GenePulser, Bio-Rad) into *E. faecium* HA1 cells following the procedure described by Bhowmik and Steele [3], and the new strain *E. faecium* JLM3 was obtained. The stability of the recombinant plasmid in the new strain was confirmed by PCR after eight successive subcultures in MRS broth (Oxoid).

Just after mating, four 10-week-old pregnant Balb/c mice (group A) were orally inoculated with 10<sup>8</sup> colony-forming units (CFU) of genetically labeled *E. faecium* JLM3 previously suspended in 200 µL of milk. Subsequently, they received the same dose every 2 days until labor. Another group (group B), quantitatively and qualitatively identical to group A, received non-inoculated milk and served as a control. All the pregnant mice were housed individually. Two days before the predicted labor date (day -2), pregnant mice were submitted to cesarean section to aseptically collect amniotic fluid samples, which were cultured on MRS agar plates. The plates were incubated for 24 h at 37°C under anaerobic conditions. The experimental design was approved by the Ethical Committee for Animal Experimental Research (University of Granada, Spain). Among the colonies that grew on the MRS plates, 14 were randomly selected and subcultured on MRS plates supplemented with Cm (7.5 µg/mL). Finally, to detect the genetically labeled strain, PCR analyses were performed using the Cm-resistant colonies as templates. When required, results are expressed below as means ± standard deviations.

## Results

In this study, samples of umbilical cord blood were collected from 20 healthy neonates born by cesarean section. From the 20 blood samples, 9 (45%) resulted in bacterial growth after an enrichment step in anaerobic BHI broth, a universal bacterial growth medium. These broth cultures were used to inoculate anaerobic BHI agar plates, and a variable number of colonies, ranging from 3 to 30 CFU, could be isolated from 100-µL samples (Table 1). All the isolates were Gram-positive cocci. A representative percentage of the isolated colonies were submitted to 16S rDNA sequencing and the following species were identified: *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Streptococcus sanguinis* (Table 1).

After oral administration of *E. faecium* JLM3 to pregnant mice, the MRS counts (day -2) in the samples of amniotic fluid obtained from the treated animals were

Table 1. Isolation and identification of the umbilical cord blood isolates

Neonate	Isolates (total number)	Sequenced isolates (number)	16S rDNA identification
3	30	10 (33%)	<i>E. faecium</i> (100%)
7	20	8 (40%)	<i>E. faecium</i> (100%)
8	30	20 (66%)	<i>E. faecium</i> (100%)
11	7	5 (71%)	<i>P. acnes</i> (3 isolates, 60%) <i>S. epidermidis</i> (2 isolates, 40%)
12	3	3 (100%)	<i>S. epidermidis</i> (100%)
13	5	5 (100%)	<i>S. epidermidis</i> (100%)
14	22	22 (100%)	<i>S. sanguinis</i> (9 isolates, 41%) <i>S. epidermidis</i> (9 isolates, 41%) <i>E. faecium</i> (4 isolates, 18%)
19	5	5 (100%)	<i>P. acnes</i> (100%)
20	6	6 (100%)	<i>P. acnes</i> (5 isolates, 83%) <i>E. faecium</i> (1 isolate, 17%)

$2.6 \pm 0.8$  log CFU/mL. It is interesting to note that bacteria were also isolated from amniotic fluid of group B animals, although at a lower level ( $1.7 \pm 0.9$  log CFU/mL); however, the labeled strain could be PCR detected in samples obtained from only group A mice (Fig. 1). A total of 14 colonies grown on MRS plates from group A samples were subcultured on MRS-Cm plates and 11 (79%) showed resistance to this antibiotic. PCR results showed that 8 Cm-resistant colonies contained the genetic label specific of the transformed *E. faecium* JLM3 cells (Fig. 1).

## Discussion

Traditionally, amniotic fluid and chorioamnion tissue have been considered sterile environments under normal conditions and, therefore, identification of any microorganism at this location was of potential concern. However, the use of traditional microbiological methods, for example, culture and Gram staining, has a very limited value in the detection of bacteria in amniotic fluid or chorioamnion because of the low bacterial concentration in such stressing environments and the difficulty of certain bacterial species to grow in culture [1]. In fact, Hitti and co-workers [11] detected bacteria by PCR in amniotic fluid samples of 36% of culture-negative women whose membranes were intact. Similarly, a more recent study showed that, among 48 samples of amniotic fluid taken from healthy women with intact membranes, 34 (71%) were positive for the presence of bacteria using 16S rDNA PCR [1]. In such study, no evidence of infective morbidity was found among the newborns and no cases of clinical chorioamnionitis were identified. In our work, the BHI plate

counts ranged from 30 to 300 CFU/mL after the enrichment step, which suggests that the initial concentration was very low. With such limitations, it seems clear that application of modern molecular microbiology techniques is required to understand the microbiological aspects of pregnancy.

The presence of Gram-negative bacteria and PCR detection of *Fusobacterium* DNA in amniotic fluid have been correlated with pregnancy complications [1]. In contrast, the mothers participating in our study enjoyed healthy pregnancies, and no Gram-negative bacteria were isolated from the samples of umbilical cord blood, despite the fact that the growth medium and conditions used during both the enrichment and the agar plating steps were suitable for growth of such bacteria. All the identified isolates belonged to the species *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Streptococcus sanguinis*. Such species, and other related ones, are naturally present in infants since the first days of life [8, 10, 17], being generally regarded as commensal in healthy infant hosts. Propionibacteria have the ability to produce short chain fatty acids, cyanocobalamin, and other useful compounds for their hosts, whereas some *E. faecium* strains are used as food starter cultures and as probiotic or bioprotective cultures [5]. Similarly, streptococci can be useful to reduce the acquisition of undesired pathogens by newborn infants exposed to hospital environments. For example, it has been shown that viridans streptococci inhibit oral colonization by methicillin-resistant *S. aureus* in infants [24]. In addition, the presence of viridans streptococci seems to be a feature of the healthy infant gut in contrast with the atopic infant gut [13]. On the other hand, the oral streptococcal species *S. sanguinis* is recognized for its antagonistic role in dental caries and periodontal diseases [2], and its artificial implantation in the oral cavity has already been proposed as a probiotic approach to prevent caries, including measures that foster a mother-to-child transmission [4]. Currently, sensitive methods, such as PCR, may detect this species as early as just after birth [4].

Such bacteria could initiate gut colonization as an adaptation of the fetal gut for life outside the mother because gastrointestinal bacteria are considered the earliest and biggest stimulus for development of gut-associated lymphoid tissue [12]. We are aware that the bacterial species isolated in this study are included among the opportunistic pathogens in infants suffering from predisposing conditions. This negative role probably reflects an easy access of such bacteria to predisposed infants because actually they may be part of their endogenous microflora even at a fetal stage. Research efforts should be focused on this aspect of perinatal microbiology.

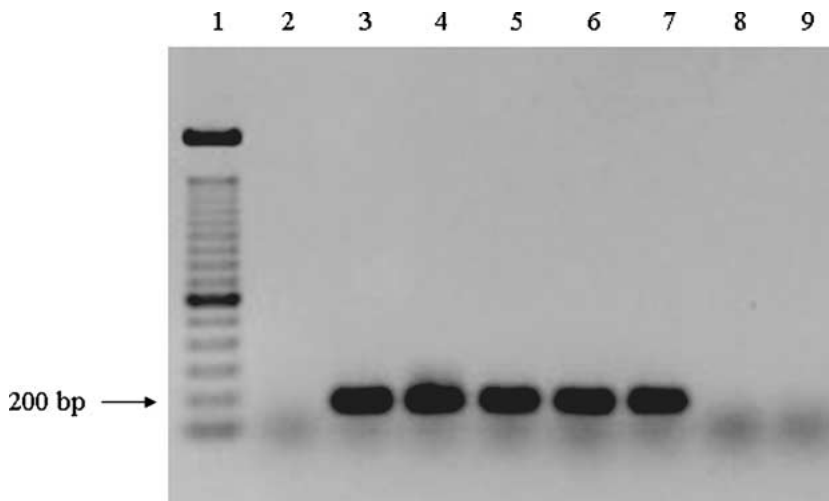


Fig. 1. PCR detection of *E. faecium* JLM3 among colonies isolated from amniotic fluid. Lane 1, 100-bp ladder (Gibco); lane 2, PCR negative control (*E. faecium* HA1); lane 3, PCR positive control (genomic DNA obtained from transgenic soy); lanes 4–7, colonies obtained from group A mice that grew in MRS-Cm agar plates; lanes 8 and 9, colonies obtained from group B mice.

The fact that an *E. faecium* strain could reach the amniotic fluid of pregnant mice after its oral administration is not strange because it has been previously reported that bacteria found in the mouth may reach the amniotic fluid via the bloodstream, particularly in the presence of gingivitis or periodontitis during pregnancy [14]. More recently, a study focused on the influence of the composition of the oral microbiota of 300 pregnant women in their pregnancy outcome revealed that some bacteria, such as *Actinomyces naeslundii*, were linked to lower birth weight and earlier delivery whereas others, such as lactobacilli, were associated with a slightly higher birth weight and delivery date. Similarly to our work, the authors suggested that oral bacteria can enter the uterine environment through the bloodstream and may influence the delivery process [6].

This would explain why the bacterial species isolated from umbilical cord blood (*Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Streptococcus sanguinis*) are usually associated with the mouth and/or gut microbiota of the mother. Interestingly, the presence of streptococci, staphylococci, and propionibacteria in chorioamnion samples of healthy mothers submitted to cesarean section has been described previously [1].

Such bacteria could have a transient spread from the digestive tract to extradigestive locations. It has been recently demonstrated that dendritic cells can penetrate the gut epithelium to directly take up bacteria from the gut lumen [20]. Using such a mechanism, a nonpathogenic strain was able to reach the spleen after oral administration to mice. Once inside or attached to dendritic cells or other lymphocyte types, bacteria could spread to other locations through the bloodstream because there is a circulation of lymphocytes within the

mucosal-associated lymphoid tissue system. Antigen-stimulated cells move from the intestinal mucosa to colonize distant mucosal surfaces, such as that of the genitourinary tract [21]. Clinical studies are in progress to elucidate the composition, origin, and significance of the fetal and neonatal microbiota, including other bacterial groups, by using more powerful molecular techniques. If our findings are verified, they could have practical consequences because they would imply that modulation of the microflora of mothers can have a direct effect on the health of infants.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the personnel of the Hospital Doce de Octubre (Madrid, Spain) who collaborated in the collection of the samples. This study was partly supported by grant AGL2003-01242 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain).

#### Literature Cited

1. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP (2002) Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *Br J Obstet Gynaecol* 109:527–533
2. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. (2002) Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40:1001–1009
3. Bhowmik T, Steele JL (1993) Development of an electroporation procedure for gene disruption in *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J Gen Microbiol* 139:1433–1439
4. Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM (2000) Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun* 68:4018–4023
5. Collins JK, Thornton G, Sullivan GO (1998) Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J* 8:487–490
6. Dasanayake AP, Li Y, Wiener H, Ruby JD, Lee MJ (2005) Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *J Periodontol* 76:171–177

7. Dodd HM, Horn N, Gasson MJ (1995) A cassette vector for protein engineering the lantibiotic nisin. *Gene* 162:163–164
8. Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 68:219–226
9. Fernández L, Marín ML, Langa S, Martín R, Reviriego C, Fernández A, et al. (2004) A novel genetic label for detection of specific probiotic lactic acid bacteria. *Food Sci Technol Int* 10:101–108
10. Heikkilä MP, Saris PEJ (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 95:471–478
11. Hitti J, Riley DE, Krohn MA, Hillier SL, Agnew KJ, Krieger JN, Eschenbach DA (1997) Broad-spectrum bacterial ribosomal RNA polymerase chain reaction for detecting amniotic fluid infection among women in preterm labor. *Clin Infect Dis* 24:1228–1232
12. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 357:1076–1079
13. Kirjavainen PV, Apostolou E, Arvola T, Salminen SJ, Gibson GR, Isolauri E (2001) Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32:1–7
14. Kornman KS, Loesche WJ (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodont Res* 15:111–122
15. Kullen MJ, Sanozy-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR (2000) Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl Microbiol* 89:511–516
16. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69:1035S–1045S
17. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 143:754–758
18. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Olivares M, et al. (2004) The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Technol* 15:121–127
19. Matsumiya Y, Kato N, Watanabe K (2002) Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Chemother* 8:43–49
20. Rescigno M, Urbano M, Valsazina B, Francoloni M, Rotta G, Bonasio R, et al. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol* 2:361–367
21. Roitt I (2001) *Essential immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications
22. Tannock GW (1995) *Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body*. London: Chapman & Hall
23. Tissier H (1900) *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique)*. Paris: G. Carre and C. Naud
24. Uehara Y, Kikuchi K, Nakamura T, Nakama H, Agematsu K, Kawakami Y, et al. (2001) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. *Clin Infect Dis* 32:1408–1413

#### **IV. ¿ES EL MECONIO DE LOS RECIÉN NACIDOS SANOS ESTÉRIL?**

**Artículo publicado en *Research in Microbiology***





# Is meconium from healthy newborns actually sterile?

Esther Jiménez<sup>a</sup>, María L. Marín<sup>a</sup>, Rocío Martín<sup>a</sup>, Juan M. Odriozola<sup>b</sup>, Mónica Olivares<sup>c</sup>,  
Jordi Xaus<sup>c</sup>, Leonides Fernández<sup>a</sup>, Juan M. Rodríguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Servicio de Obstetricia, Hospital Universitario Doce de Octubre, 28041 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Biomedicina, Puleva Biotech, 18004 Granada, Spain

Received 15 October 2007; accepted 21 December 2007

Available online 11 January 2008

## Abstract

In a previous study, bacteria were able to be isolated from umbilical cord blood of healthy neonates and from murine amniotic fluid obtained by caesarean section. This suggested that term fetuses are not completely sterile and that a prenatal mother-to-child efflux of commensal bacteria may exist. Therefore, the presence of such bacteria in meconium of 21 healthy neonates was investigated. The identified isolates belonged predominantly to the genera *Enterococcus* and *Staphylococcus*. Later, a group of pregnant mice were orally inoculated with a genetically labelled *E. fecium* strain previously isolated from breast milk of a healthy woman. The labelled strain could be isolated and PCR-detected from meconium of the inoculated animals obtained by caesarean section one day before the predicted date of labor. In contrast, it could not be detected in samples obtained from a non-inoculated control group.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Meconium; Gut; Fetus, *Enterococcus*; *Staphylococcus*

## 1. Introduction

Since Tissier's time [37], the idea that term fetuses are sterile, and that initial bacterial colonization of the newborn gut occurs only when the baby initiates transit through the labor channel via contamination by maternal vaginal and fecal bacteria, has been widely accepted [21]. In this context, meconium, amniotic fluid and chorioamnion tissue have been considered sterile under normal conditions; therefore, the presence of bacteria in such environments is only investigated when there are symptoms of infection or circumstances that may facilitate it, such as premature rupture of membranes or cervical dilatation. However, clinical practice supports the potential presence of bacteria in fetal meconium, since meconium-stained amniotic fluid is considered a marker of microbial invasion of the amniotic cavity in women with preterm labor and intact membranes [9,27,32]. Obviously, identification of any microorganism at this location is a potential concern under such circumstances.

In contrast, the presence of bacteria in such locations during healthy pregnancies has not been assessed despite the fact that bacteria can be isolated and/or PCR-detected in umbilical cord blood, amniotic fluid and fetal membranes without any clinical or histological evidence of infection or inflammation in the mother-infant pair [3,13,14,35]. Since amniotic fluid surrounds and is continuously swallowed by fetuses, the first objective of this study was to elucidate whether meconium obtained from healthy hosts is actually sterile or if, on the contrary, it contains bacteria. Recently, it has been shown that the maternal digestive tract may be the origin of bacteria found in amniotic fluid [7,14,16]; therefore, the second objective of this study was to elucidate whether oral administration of a bacterial strain to pregnant mice may lead to its presence in fetal meconium.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Source and isolation of bacterial isolates

First meconium was collected from 21 term newborns in the Servicio de Obstetricia, Hospital Universitario Doce de

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 3837; fax: +34 91 394 3743.

E-mail address: [jmrodrig@vet.ucm.es](mailto:jmrodrig@vet.ucm.es) (J.M. Rodríguez).

Octubre, Madrid (Spain). The newborns were selected as donors according to the following criteria: (a) meconium was spontaneously evacuated within the first 2 h of life and before they were breastfed; (b) babies were born to healthy mothers after normal pregnancy; and (c) mothers did not receive probiotic supplementation during pregnancy. Informed consent was obtained from their mothers. Ethical clearance for the study was obtained from the Ethical Committee in Human Clinical Research (Hospital Clínico, Madrid, Spain).

Approximately half of the samples (samples 1–11;  $n = 11$ ) were immediately processed after collection, while the remaining ones (samples 12–21;  $n = 10$ ) were stored at 4–8 °C for 4 days. In order to avoid potential bacterial contamination derived from contact between meconium and perianal skin/nappies, one of the poles of each meconium sample was removed using a laser scalpel. Then, an internal meconium portion was underwent microbiological analysis. Proper peptone water dilutions of the meconium samples were plated in triplicate onto brain heart infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK), violet red bile agar (VRBA; Difco, Detroit, MI), and Columbia nadilixic acid agar (CNA, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) agar plates, which were aerobically incubated at 37 °C for 24 h. In parallel, the same samples were also cultured on Wilkins-Chalgren (WCh, Oxoid) and de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid) agar plates, which were incubated anaerobically (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in an anaerobic work station (MINI-MACS, DW Scientific, Shipley, UK) at 37 °C for 48 h. Comparison of meconium bacterial counts obtained in the different culture media was done using Student's *t*-tests. An exploratory multivariate statistical method for identifying similar characteristics in an observation group (hierarchical cluster analysis) was performed using Euclidean distances and the single linkage (nearest neighbor) method. Statgraphics Plus 5.0 software (Manugistics, Inc., Rockville, MD) was used for statistical analysis and generation of a dendrogram.

Between 5 and 10 isolates from each culture medium in which growth was observed ( $\sim 35$  isolates per sample) were randomly selected, grown in BHI or WCh broth depending on the original culture media and conditions and stored at –80 °C in the presence of glycerol (30%, v/v). The isolates were examined by phase-contrast microscopy to determine cell morphology and Gram-staining reaction. Subsequently, a percentage of the isolates representative of all the colony and cell morphologies observed was submitted to 16S rDNA sequencing. Briefly, a single colony growing on solid media was removed with a sterile plastic tip and resuspended in 100  $\mu$ l of sterile deionized water in a microcentrifuge tube. Then 100  $\mu$ l of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) was added to the suspensions, and after vortexing for 5 s the mixture was centrifuged at  $16,000 \times g$  for 5 min at 4 °C [33]. Then 5–10  $\mu$ l of the upper aqueous phase was used as a source of DNA template for PCR amplifications that were carried out in DNA thermal cyclers (Techne, Cambridge, UK). PCR amplifications were performed using primers plb16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and mlb16 (5'-GGCTGCTGCACGTAGTTAG-3'), and the following program: [(96 °C for

4 min)  $\times$  1 cycle] + [(96 °C for 30 s; 48 °C for 30 s; 72 °C for 45 s)  $\times$  30 cycles] + [(72 °C for 4 min)  $\times$  1 cycle]. The primers, based on conserved regions of the 16S rRNA gene [18], were used to direct PCR amplification of an approximately 500 bp portion of such a gene. Five  $\mu$ l of the PCR mixtures were analyzed on a 1.2% (w/v) agarose (Sigma, St. Louis, USA) gel with ethidium bromide staining. A 100 bp ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) was used as a molecular weight standard. The amplicons were purified using the Nucleospin® Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Unit of the Universidad Complutense de Madrid, Spain. The resulting sequences were used to search sequences deposited in the EMBL database using the BLAST algorithm, and the identity of the isolates was determined on the basis of the highest scores (>98%).

## 2.2. Oral administration of a labelled *Enterococcus fecium* strain to pregnant mice

*E. fecium* HA1, a breast milk isolate [22], was selected to investigate the potential mother-to-child transfer of commensal bacteria through the placental barrier in a murine model. Since labelled *E. fecium* cells were required, a genetic label previously developed by our group was used [11]. Briefly, a 189 bp PCR fragment comprising the junction between the 35S rRNA promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV) and the EPSPS gene of *Agrobacterium tumefaciens* was amplified from transgenic soya kindly provided by Biotools (B&M Labs, Madrid, Spain) using primers EPSP1 (5'-CGCGGATCCTGATGTGATATCTCCACTGACG-3') and EPSP2 (5'-CGCGGATCCTGTATCCCTTGAGCCATGTTGT-3'). EPSP1 was based on primer P35S-F2 [38], while EPSP2 was designed from the artificial sequence present in Roundup Ready soya (EMBL accession number: AX033493). Both primers were designed with BamHI sites in their 5'-tails (underlined sequences) to facilitate cloning of the fragment in pTG262, a lactococcal-*E. coli* shuttle vector that confers resistance to chloramphenicol (Cm) [8]. The PCR mixture (25  $\mu$ l) consisted of 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs, 50 pmol of each primer, 0.7 U Taq DNA polymerase (Biotools), and 2.5  $\mu$ l of transgenic soya genomic DNA as template. DNA was amplified in a Techne thermal cycler as follows: 94 °C for 10 min, 25 cycles of 94 °C for 30 s, 65 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s; and then a final extension at 72 °C for 3 min. Once obtained, the PCR product was purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), digested with BamHI, and ligated into pTG262. Subsequently, the resulting plasmid was introduced into *E. fecium* HA1 cells following the procedure described by Bhowmik and Steele [4], and strain *E. fecium* JLM3 was obtained. The stability of the recombinant plasmid in the new strain was confirmed by PCR after eight successive subcultures in MRS (Oxoid) broth.

Just after mating, four 10-week-old pregnant BALB/c mice (group A) were orally inoculated with 8 log<sub>10</sub> colony-forming units (CFUs) of genetically labelled *E. fecium* JLM3 previously suspended in 200  $\mu$ l of milk. Subsequently, they

received the same dose daily until labor. Another group (group B), quantitatively and qualitatively identical to group A, received non-inoculated milk and served as a control. All pregnant mice were housed individually. One day before the predicted labor date (day  $-1$ ), pregnant mice were submitted to caesarean section to aseptically collect meconium samples from term fetuses (8 samples from each group), which were cultured on MRS agar plates. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. Among colonies that grew on MRS plates, 20 colonies from each group were randomly selected and subcultured on MRS plates supplemented with Cm (7.5 µg/mL). Finally, to detect the genetically labelled strain, PCR analyses were performed using the Cm-resistant colonies as templates. When required, results are expressed below as means  $\pm$  standard deviations.

The experimental design was approved by the Ethical Committee for Animal Experimental Research (Universidad Complutense de Madrid, Spain).

### 3. Results

#### 3.1. Bacterial diversity in meconium

In this study, samples of meconium were collected from 21 healthy neonates born by either vaginal delivery or caesarean section. In general, inoculation of suitable dilutions of the meconium samples led to bacterial growth in the culture media tested (Table 1). However, there were some exceptions, since no colonies could be isolated on VRBA plates from 11 samples,

and the same happened with three samples for CNA and one sample for MRS plates. For the other media and/or the rest of the samples, the mean count values varied, depending on the sample: from 2.04 to 10.41 log CFU/g in BHI; from 3.84 to 10.48 log CFU/g in VRBA; from 1.88 to 10.39 log CFU/g in CNA; from 1.84 to 10.66 log CFU/g in WCh; and from 1.82 to 10.69 log CFU/g in MRS plates (Table 1).

Although all meconium samples were obtained within the first 2 h of life, samples 1–11 (group A;  $n = 11$ ) were immediately processed, while samples 12–21 (group B;  $n = 10$ ) were stored at 4–8 °C for 4 days. The differences in the bacterial counts between the two groups were highly significant ( $P \leq 0.001$ , Student's  $t$ -test) (Table 1) and revealed that prolonged storage of the samples at 4–8 °C may lead to overestimation of the bacterial concentration in meconium. Subsequently, the bacterial counts obtained in the five culture media tested were used to investigate the relatedness of the samples by cluster analysis. The dendrogram (Fig. 1) showed that the samples could be clustered into 2 well defined groups. The first cluster ( $n = 10$ ) included all samples from group A (with the exception of sample 8) which were characterized by bacterial counts  $\leq 6 \log_{10}$  CFU/g (Table 1). This cluster contained most of the samples from which bacterial growth could not be detected on VRBA, CNA and/or MRS agar plates (Table 1). The second cluster ( $n = 11$ ) included all samples from group A and sample 8 (Fig. 1). Such samples were associated with bacterial counts  $> 6 \log_{10}$  CFU/g (Table 1). Therefore, multivariate analysis also demonstrated that clustering for bacterial counts was strongly associated with the sample processing time and/or storage temperature.

Table 1  
Bacterial mean counts ( $\log_{10}$  CFU/g  $\pm$  SD) in meconium samples

Group	Sample	BHI	VRBA	CNA	WCh	MRS
A	1	3.73 $\pm$ 1.35	ND	4.39 $\pm$ 0.30	3.60 $\pm$ 1.35	2.82 $\pm$ 0.00
	2	6.17 $\pm$ 0.14	3.84 $\pm$ 0.00	6.32 $\pm$ 0.06	5.19 $\pm$ 0.18	5.57 $\pm$ 0.10
	3	6.00 $\pm$ 0.07	5.69 $\pm$ 0.00	ND	5.87 $\pm$ 0.14	6.00 $\pm$ 0.12
	4	6.00 $\pm$ 0.14	ND	ND	6.90 $\pm$ 0.24	ND
	5	4.11 $\pm$ 0.39	ND	2.72 $\pm$ 0.23	4.27 $\pm$ 0.33	4.20 $\pm$ 0.17
	7	2.04 $\pm$ 0.29	ND	1.88 $\pm$ 0.31	1.84 $\pm$ 0.01	1.82 $\pm$ 0.22
	7	3.84 $\pm$ 0.21	ND	ND	3.93 $\pm$ 0.337	3.91 $\pm$ 0.45
	8	8.85 $\pm$ 0.06	ND	9.11 $\pm$ 0.10	8.79 $\pm$ 0.19	8.79 $\pm$ 0.07
	9	4.00 $\pm$ 0.04	ND	2.08 $\pm$ 0.29	7.01 $\pm$ 0.16	3.69 $\pm$ 0.00
	10	5.22 $\pm$ 0.14	ND	5.22 $\pm$ 0.11	5.29 $\pm$ 0.09	4.52 $\pm$ 0.30
	11	5.42 $\pm$ 0.77	ND	5.46 $\pm$ 0.07	4.71 $\pm$ 0.08	4.19 $\pm$ 0.28
	Mean	5.03 $\pm$ 1.79	4.76 $\pm$ 1.31	4.65 $\pm$ 2.44	5.22 $\pm$ 1.90	4.55 $\pm$ 1.91
B	12	10.05 $\pm$ 0.29	9.12 $\pm$ 0.03	10.06 $\pm$ 0.09	10.55 $\pm$ 0.02	10.69 $\pm$ 0.05
	13	9.55 $\pm$ 0.04	7.70 $\pm$ 0.32	9.62 $\pm$ 0.03	10.27 $\pm$ 0.10	10.29 $\pm$ 0.07
	14	10.41 $\pm$ 0.03	10.48 $\pm$ 0.00	9.17 $\pm$ 0.16	10.47 $\pm$ 0.09	10.41 $\pm$ 0.13
	15	9.87 $\pm$ 0.14	9.46 $\pm$ 0.05	9.94 $\pm$ 0.02	9.89 $\pm$ 0.07	9.84 $\pm$ 0.00
	16	10.32 $\pm$ 0.04	10.15 $\pm$ 0.03	9.75 $\pm$ 0.21	10.28 $\pm$ 0.06	9.65 $\pm$ 0.03
	17	8.69 $\pm$ 0.06	8.55 $\pm$ 0.24	6.28 $\pm$ 0.15	8.79 $\pm$ 0.02	6.08 $\pm$ 0.12
	18	9.01 $\pm$ 0.88	7.71 $\pm$ 0.43	7.67 $\pm$ 0.29	8.01 $\pm$ 0.05	7.44 $\pm$ 0.22
	19	9.86 $\pm$ 0.01	ND	10.06 $\pm$ 0.15	10.66 $\pm$ 0.03	10.62 $\pm$ 0.23
	20	10.33 $\pm$ 0.09	ND	10.39 $\pm$ 0.06	10.54 $\pm$ 0.1	10.43 $\pm$ 0.04
	21	10.08 $\pm$ 0.07	10.18 $\pm$ 0.00	6.72 $\pm$ 0.08	9.46 $\pm$ 0.02	7.05 $\pm$ 0.11
	Mean	9.82 $\pm$ 0.58*	9.17 $\pm$ 1.10*	8.97 $\pm$ 1.50*	9.89 $\pm$ 0.88*	9.25 $\pm$ 1.71*

ND: not detected. \*Statistically significant difference with respect to group A ( $P < 0.001$ ).

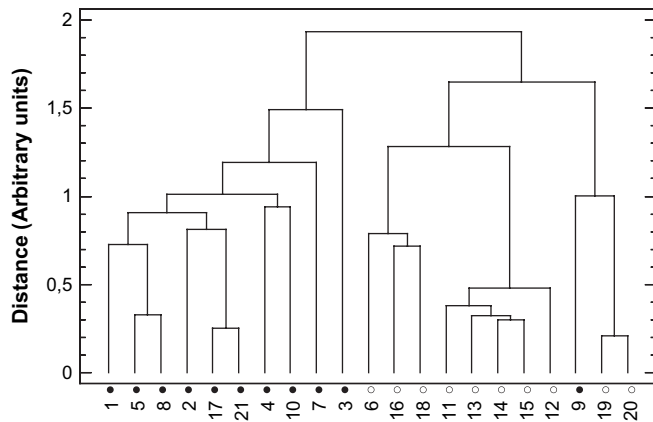


Fig. 1. Dendrogram obtained by hierarchical cluster analysis of bacterial counts achieved from meconium samples. (●): group A samples. (○): group B samples.

Identification of isolates from the different growth media revealed that enterococci were present in 17 (80%) of the 21 samples, with *E. fecalis* being the predominant species, since it was present in the 17 samples (Table 2). Staphylococci were the second bacterial group in quantitative terms, and they were detected in 11 (52%) of the samples; *Staphylococcus epidermidis*, which could be isolated from 10 samples, was the predominant staphylococcal species. *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp. were detected in 6 and 5 samples, respectively, and formed the third predominant group (Table 2). The rest of the bacterial species identified in this study (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Rothia mucilaginosa*, *Klebsiella* spp.) could only be isolated from one of the samples (Table 2). The number of different bacterial species detected in a single meconium sample varied between 5 and 1.

### 3.2. Oral administration of a labelled *E. fecium* strain to pregnant mice led to its presence in meconium

Following oral administration of *E. fecium* JLM3 to pregnant mice, MRS counts (day -1) in the samples of meconium obtained from mouse term fetuses ( $n = 8$ ) were  $2.6 \pm 0.8 \log_{10}$  CFU/ml. It is interesting to remark that bacteria were also isolated from meconium of group B animals, although at a lower level ( $1.7 \pm 0.9 \log_{10}$  CFU/ml); however, the labelled strain could be PCR-detected in samples obtained only from group A mice (Fig. 2). A total of 20 colonies grown on MRS plates from group A samples were subcultured on MRS-Cm plates and 15 showed resistance to chloramphenicol. PCR results showed that, among the Cm-resistant colonies, 12 contained the genetic label specific to the transformed *E. fecium* JLM3 cells (Fig. 1). PCR sequencing revealed that the PCR product corresponded exactly to the genetic label. In parallel, 20 colonies isolated on MRS plates from group B samples were subcultured on MRS-Cm plates and only 5 showed resistance to chloramphenicol. As expected, none of these 5 Cm-resistant colonies harbored the genetic label (Fig. 2).

**Table 2**  
**Bacterial species identified in meconium samples**

[illegible]



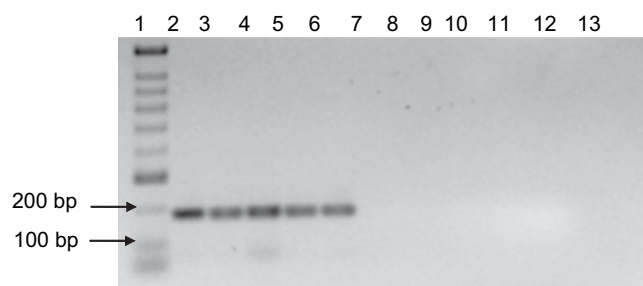


Fig. 2. PCR detection of *E. fecium* JLM3 among colonies isolated from meconium. Lane 1, 100 bp ladder (Bioline, London, UK); lane 2, PCR positive control (genomic DNA obtained from transgenic soy); lanes 3–7, colonies obtained from group A mice that grew on MRS-Cm agar plates; lanes 8–12, colonies obtained from group B mice; lane 13, PCR-negative control (*E. fecium* HA1).

#### 4. Discussion

In this study, bacteria could be isolated from meconium obtained from healthy neonates, which suggests that, contrary to what has been hypothesized up to the present, this biological material may not be sterile. The number of bacterial species detected in the samples varied between 1 and 5, and *E. fecalis*, *S. epidermidis* and *E. coli* were the predominant species. Different studies have shown that high concentrations of coagulase-negative enterococci, staphylococci, and enterobacteria colonize the gut of vaginally and caesarean-delivered term and preterm neonates even from the first day of life [1,2,5,20,34]. Such bacterial groups may play important biological roles in the neonatal gut. *S. epidermidis* is the predominant bacterial species in breast milk of healthy women, and administration of milk to preterms is associated with a decrease in infection rates. Since *S. epidermidis* is one of the main causes of neonatal infection, the staphylococcal strains provided first by meconium and later by breast milk may successfully compete with potentially pathogenic strains found in the hospital environment. *E. coli* is also among the first colonizers of the infant gut [10] and mother-to-infant transmission of fecal isolates of *Enterobacteriaceae* has been described previously, although the route of transmission is unknown [36]. The species *E. coli* contains non-pathogenic and pathogenic bacteria, and commensal strains generally represent normal inhabitants of the human gut. In fact, *E. coli* strain Nissle 1917 (O6:K5:H1) is employed in an infant probiotic preparation and different studies have shown that its oral application to full-term and premature infants reduces the number and incidence of infections, stimulates specific humoral and cellular responses and induces non-specific natural immunity [6,19]. It is possible that other bacteria, such as lactobacilli or bifidobacteria, the isolation of which is difficult in standard culture media and/or conditions may be present in meconium of a higher number of neonates.

The presence of such bacteria in meconium may explain the origin of these first gut colonizers. Such bacteria could initiate gut colonization as an adaptation to fetal gut for life outside the mother, since gastrointestinal bacteria are considered the earliest and strongest stimulus for development of gut-associated

lymphoid tissue [15]. Later, the role of meconium as a source of commensal bacteria to the infant gut is continued by breast milk, since it also contains such microorganisms [12,22,24,30]. In contrast, some studies have questioned the importance of transit through the vagina, which would have, if any, a minor role in bacterial colonization of the newborn [22,25,26].

In relation to mice assays, MRS counts (day –1) in meconium samples from group A fetuses were approximately  $1 \log_{10}$  CFU/ml higher than those obtained from group B fetuses. Such a difference may be due to the high enterococcal doses received by group A pregnant mice. The fact that oral administration of an enterococcal strain to pregnant mice led to their presence in meconium is not surprising, since it has been reported that bacteria from the digestive tract can reach amniotic fluid through the blood stream [16]. Another study which focused on the influence of the composition of oral microbiota of pregnant women in the pregnancy outcome showed that some bacteria, such as *Actinomyces naselundii*, were associated with lower birth weight and earlier delivery, while others, such as lactobacilli, were linked to a higher birth weight and delivery date. The results of such a study suggested that oral bacteria can enter the uterine environment through the bloodstream and may influence the delivery process [7]. This would explain why the bacterial species isolated from meconium are usually associated with the mouth and/or gut microbiota of the mother. Interestingly, the presence of streptococci and staphylococci in chorioamnion samples of healthy mothers who underwent caesarean section has been described previously [3]; in addition, bifidobacteria have been recently isolated from human meconium [17]. These bacteria could have a transient spread from the digestive tract to extra-digestive locations. It has been demonstrated that dendritic cells can penetrate the gut epithelium to directly take up bacteria from the gut lumen [29]. Once associated with dendritic cells, live bacteria can spread to other locations through the blood stream, since there is a circulation of cells of the immune system within the mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) system. Antigen-stimulated cells move from the intestinal mucosa to colonize distant mucosal surfaces, such as those of the genitourinary tract [31]. In addition, during late pregnancy and lactation, there is selective colonization of the mammary gland by cells of the immune system (the so-called entero-mammary pathway) and this mechanism has been proposed to explain the presence of maternal gut bacteria in breast milk [23,28]. This process is responsible for the abundance of such cells in human milk. It is likely that the same mechanism may be responsible for the presence of gut bacteria in meconium.

Most of the bacterial species isolated in this study are included among opportunistic pathogens in neonates suffering from underlying conditions. This negative role probably reflects easy access of such bacteria to predisposed infants since, in fact, they may be part of their endogenous microbiota even at a fetal stage.

Overall, our results suggest that meconium of term infants is not a sterile environment and therefore gut colonization may start before birth. In addition, the bacterial composition of the maternal gut could affect (both qualitatively and quantitatively)

the bacterial content of infant meconium. Work is in progress to assess the bacterial diversity of this biological material using molecular microbiology techniques.

## Acknowledgements

We are grateful to the personnel of the Hospital Doce de Octubre (Madrid, Spain) who collaborated in collection of the samples. This study was supported by grants FUN-C-FOOD (Consolider-Ingenio 2010), AGL2005-01138 and AGL2007-62042 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain).

## References

- [1] Adlerberth, I., Lindberg, E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I.L., et al. (2006) Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle. *Pediatric Research* 59, 96–101.
- [2] Balmer, S.E., Wharton, B.A. (1989) Diet and fecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Archives of Disease in Childhood* 64, 1672–1677.
- [3] Bearfield, C., Davenport, E.S., Sivapathasundaram, V., Allaker, R.P. (2002) Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 109, 527–533.
- [4] Bhowmik, T., Steele, J.L. (1993) Development of an electroporation procedure for gene disruption in *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of General Microbiology* 139, 1433–1439.
- [5] Borderon, J.C., Lionnet, C., Rondeau, C., Suc, A.I., Laugier, J., Gold, F. (1996) Current aspects of fecal flora of the newborn without antibiotherapy during the first 7 days of life: enterobacteriaceae, enterococci, staphylococci. *Pathologie Biologie* 44, 416–422.
- [6] Cukrowska, B., Lodinová-Žádníková, R., Enders, C., Sonnenborn, U., Schulze, J., Taskalova-Hogenova, H. (2002) Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with non-pathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scandinavian Journal of Immunology* 55, 204–209.
- [7] Dasanayake, A.P., Li, Y., Wiener, H., Ruby, J.D., Lee, M.J. (2005) Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *Journal of Periodontology* 76, 171–177.
- [8] Dodd, H.M., Horn, N., Gasson, M.J. (1995) A cassette vector for protein engineering the lantibiotic nisin. *Gene* 162, 163–164.
- [9] Eidelman, A.I., Nevet, A., Rudensky, B., Rabinowitz, R., Hammerman, C., Raveh, D., et al. (2002) The effect of meconium staining of amniotic fluid on the growth of *Escherichia coli* and Group B *Streptococcus*. *Journal of Perinatology* 22, 467–471.
- [10] Favier, C.F., Vaughan, E.E., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L. (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 219–226.
- [11] Fernández, L., Marín, M.L., Langa, S., Martín, R., Reviriego, C., Fernández, A., et al. (2004) A novel genetic label for detection of specific probiotic lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International* 10, 101–108.
- [12] Heikkilä, M.P., Saris, P.E.J. (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology* 95, 471–478.
- [13] Hitti, J., Riley, D.E., Krohn, M.A., Hillier, S.L., Agnew, K.J., Krieger, J.N., et al. (1997) Broad-spectrum bacterial ribosomal RNA polymerase chain reaction for detecting amniotic fluid infection among women in preterm labor. *Clinical Infectious Diseases* 24, 1228–1232.
- [14] Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., et al. (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by caesarean section. *Current Microbiology* 51, 270–274.
- [15] Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E. (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 357, 1076–1079.
- [16] Kornman, K.S., Loesche, W.J. (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *Journal of Periodontal Research* 15, 111–122.
- [17] Kukkonen, K., Savilahti, E., Haahtela, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., et al. (2007) Probiotics and probiotic galactooligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, 192–198.
- [18] Kullen, M.J., Sanozy-Dawes, R.B., Crowell, D.C., Klaenhammer, T.R. (2000) Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology* 89, 511–516.
- [19] Lodinová-Žádníková, R., Sonnenborn, U. (1997) Effect of preventive administration of a non-pathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biology of the Neonate* 71, 224–232.
- [20] Lundquist, B., Nord, C.E., Winberg, J. (1985) The composition of the fecal microflora in breastfed and bottle-fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatric Scandinavica* 74, 45–51.
- [21] Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R. (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition* 69, 1035S–1045S.
- [22] Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., et al. (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics* 143, 754–758.
- [23] Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Olivares, M., et al. (2004) The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 15, 121–127.
- [24] Martín, R., Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., et al. (2007) Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research Microbiology* 158, 31–37.
- [25] Martín, R., Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J.M. (2007) Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2638–2644.
- [26] Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K. (2002) Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal of Infection and Chemotherapy* 8, 43–49.
- [27] Mazar, M., Furman, B., Wiznitzer, A., Shoham-Vardi, I., Cohen, J., Ghezzi, F. (1995) Maternal and perinatal outcome of patients with preterm labor and meconium-stained amniotic fluid. *Obstetrics and Gynecology* 86, 830–833.
- [28] Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., et al. (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119, e724–e732.
- [29] Rescigno, M., Urbano, M., Valsazina, B., Francoloni, M., Rotta, G., Bonasio, R., et al. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology* 2, 361–367.
- [30] Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J., et al. (2005) Screening of virulence determinants in *Enterococcus fecium* strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation* 21, 131–137.
- [31] Roitt, I. (2001) *Essential immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- [32] Romero, R., Hanaoka, S., Mazar, M., Athanassiadis, A.P., Callahan, R., Hsu, Y.C., et al. (1991) Meconium-stained amniotic fluid: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *American Journal of Obstetrics Gynecology* 164, 859–862.
- [33] Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R. (2005) Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry* 347, 333–335.

- [34] Sakata, H., Yoshioka, H., Fujita, K. (1985) Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *European Journal of Pediatrics* 144, 186–190.
- [35] Steel, J.H., Malatos, S., Kennea, N., Edwards, D., Miles, L., Duggan, P., et al. (2005) Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatric Research* 57, 404–411.
- [36] Tannock, G.W., Fuller, R., Smith, S.L., Hall, M.A. (1990) Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 1225–1228.
- [37] Tissier, H. (1900) *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique)*. Paris: G. Carre and C. Naud.
- [38] Wurz, A., Willmund, R. (1997). In: G.A. Schreiber, & K.W. Bögl (Eds.), *Food produced by means of genetic engineering*, 2nd status report (pp. 115–117). Berlin: Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinarmedizin (BgVV).



**V. EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DEL  
CALOSTRO HUMANO MEDIANTE TÉCNICAS DEPENDIENTES DE  
CULTIVO. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES ESTAFILOCÓCICA Y  
ENTEROCÓCICA**

**Artículo publicado en *Research in Microbiology***



# Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors

Esther Jiménez<sup>a</sup>, Susana Delgado<sup>a</sup>, Leonides Fernández<sup>a</sup>, Natalia García<sup>b</sup>, Mar Albújar<sup>b</sup>,  
Adolfo Gómez<sup>b</sup>, Juan M. Rodríguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Servei de Pediatria, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain

Received 22 April 2008; accepted 9 September 2008

Available online 19 September 2008

## Abstract

In contrast to breast milk, little is known about the bacterial composition of human colostrum. The objective of this work was to analyze the bacterial diversity of colostrum obtained from healthy women and to characterize the dominant bacterial species for the presence of possible virulence factors. Samples of colostrum obtained from 36 healthy women were inoculated into different culture media. Several isolates from each medium were selected and identified. Staphylococcal and enterococcal isolates were submitted to genetic profiling. One representative of each profile was included in a genetic and phenotypic characterization scheme, including detection of potential virulence traits/genes and sensitivity to antibiotics. *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* were the dominant species, followed by *Streptococcus mitis*, *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus lugdunensis*. Among the 48 *S. epidermidis* isolates selected on the basis of their genetic profiles, the biofilm-related *icaD* gene and the *mecA* gene were detected in only 11 and six isolates, respectively. In parallel, 10 enterococcal isolates were also characterized and none of them contained the *cylA*, *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* and *vanG* genes. All of them were sensitive to vancomycin. There were no indications that the colostrum samples contained harmful bacteria.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Colostrum; *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus*; Gut colonization

## 1. Introduction

Colostrum is a yellowish biological fluid produced by the mammary glands in late pregnancy and in the first few days after birth. Although colostrum is produced in small quantities, it contains a high concentration of nutrients and elements of the immune system, including immunoglobulins, immunocompetent cells and cytokines. Therefore, it is widely admitted that colostrum plays a key role in the protection of the neonate against infectious diseases.

Recently, breast milk has been shown to be a continuous source of potentially probiotic bacteria to the infant gut,

including staphylococci, streptococci and lactic acid bacteria [17,25], which may also play an important role in the antimicrobial protection of the infant [19]. It is estimated that an infant consuming approximately 800 ml per day will ingest about 5–7 log<sub>10</sub> CFU commensal bacteria while suckling [11]. Therefore, it is not strange that the bacterial composition of the infant fecal microbiota reflects that of breast milk [16].

In contrast to milk, colostrum has not been the subject of a specific bacteriological study as yet; however, this is an important issue in perinatal biology since, if this biological fluid also contains bacteria, these would be among the first colonizers of the neonatal gut. This could be particularly relevant for those neonates born by Caesarean section and who therefore are not exposed to maternal bacteria during the transit through the birth canal. In this context, the objective of this work was to analyze

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 3837; fax: +34 91 394 3743.

E-mail address: [jmrodrig@vet.ucm.es](mailto:jmrodrig@vet.ucm.es) (J.M. Rodríguez).

the bacterial diversity of colostrum obtained from healthy women. Furthermore, since colostrum is considered an important and safe biological fluid for neonates, the isolates belonging to staphylococcal and enterococcal species were investigated for potential virulence traits.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Source and isolation of bacterial isolates

A total of 36 women participated in the study and were enrolled according to the following criteria: (a) healthy women without present or past underlying conditions; (b) normal full-term pregnancy; and (c) absence of infant and/or maternal perinatal problems. All volunteers gave written informed consent to the protocol, which was approved by the Ethical Committee of the Hospital Joan XXIII (Tarragona, Spain). The colostrum samples were collected during the first 6 h after delivery in a sterile tube by manual expression using sterile gloves. Before that, nipples were cleaned with soap and sterile water, and soaked in chlorhexidine (Cristalmina, Salvat, Barcelona, Spain). The first drops (~150 µl) were discarded. The samples were kept at 4 °C until delivery to the laboratory.

Proper peptone water dilutions of the colostrum samples were plated in triplicate onto brain heart infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK), a general-purpose medium for the cultivation of non-fastidious bacteria, yeasts and moulds, violet red bile agar (VRBA; Difco, Detroit, MI), a selective medium for the isolation of enterobacteria and Columbia nadilixic acid agar (CNA, BioMerieux), a highly nutritious, general-purpose medium for the isolation and cultivation of fastidious microorganisms, on agar plates, which were aerobically incubated at 37 °C for 24 h. In parallel, the samples were also cultured on Wilkins–Chalgren (WCh, Oxoid), a general medium for isolating anaerobic bacteria, and de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid), a medium for the isolation of lactic acid bacteria and bifidobacteria, on agar plates, which were incubated anaerobically (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in an anaerobic work station (MINI-MACS, DW Scientific, Shipley, UK) at 37 °C for 48 h. The lower limit of detection was 50 colony-forming units (CFU)/ml (1.69 log<sub>10</sub> CFU/ml). Bacterial counts were normalized by a natural-logarithm transformation. To get an impression of the central tendency and variation in data, descriptive statistics were calculated for the log bacterial counts in each culture media. Pearson's product-moment correlation was used to assess the association between bacterial counts in the different culture media. All analyses were carried using Statgraphics Plus 5.0 software (Manugistics, Inc., Rockville, MD).

### 2.2. Identification of bacterial isolates

Between five and 10 isolates from each culture medium on which growth was observed (~35 isolates per sample) were randomly selected, grown in BHI broth and stored at –80 °C in the presence of glycerol (30%, v/v). The selected isolates were observed by optical microscopy to determine

morphology and Gram staining. Additionally, they were assayed for catalase, oxidase, coagulase and other biochemical tests and for growth on plates of Baird Parker (BP, Bio-Merieux), a selective medium for the isolation of staphylococci, and kanamycin aesculin azide agar (KAA, Oxoid), a selective medium for the isolation of enterococci.

Initially, most of the isolates that, on the basis of such preliminary tests, seemed to belong to the genus *Staphylococcus* were identified as *S. epidermidis* or *S. aureus* by a novel multiplex PCR method based on the *tuf* gene [20]. A colony of each isolate was suspended in 20 µL of deionized sterile water; 5 µL of the suspension were used as a template for PCR using the BioeredMix (BioLine, London, UK) system and the primers (10 µM) *tuf-g* (5'-GGTGTACCAGCATAGT-3'), *tuf-a* (5'-TTCAGTATGTGGTGTA-3') and *tuf-e* (5'-TTCGTGCATACCGATGA-3') in an Icyler thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The primer pairs *tuf-g/tuf-e* and *tuf-g/tuf-a* result in a 370 bp *S. epidermidis* species-specific fragment and a 530 bp *S. aureus* species-specific fragment, respectively. PCR conditions were 1 cycle of 94 °C for 5 min, 30 cycles of 94 °C for 1 min, 48 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, and a final extension of 72 °C for 5 min. The specificity of the assay was confirmed using, as negative controls, a wide spectrum of strains belonging to the following species of the genus *Staphylococcus*: *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis* and *S. haemolyticus*.

Most of the isolates that seemed to belong to the genus *Enterococcus* were identified by species-specific PCR detection of enterococcal *ddl* genes, which encode D-alanine:D-alanine ligases [6]. For this purpose, four primers were used: E<sub>1</sub> (5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTT-3'), E<sub>2</sub> (5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'), F<sub>1</sub> (5'-GCAAGGCTTCTTAGAGA-3'), and F<sub>2</sub> (5'-CATCGTGTAAAGCTAACTTC-3'). The first pair (E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>) specifically detects *Enterococcus faecium* strains, while the second (F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>) is specific for *Enterococcus faecalis*.

Identification of other isolates (and confirmation of previous identifications of staphylococci and enterococci) was performed by PCR sequencing of a 470 bp fragment of the 16S rRNA gene using primers pbl16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and mlb16 (5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3') [13]. The PCR conditions were 96 °C for 30 s, 48 °C for 30 s and 72 °C for 45 s (40 cycles) and a final extension at 72 °C for 4 min. The amplicons were purified using the Nucleospin® Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Unit of the Universidad Complutense de Madrid. The resulting sequences were used to search sequences deposited in the EMBL database using BLAST algorithm and the identity of the isolates was determined on the basis of the highest scores (>99%).

### 2.3. Genetic profiling of the staphylococcal and enterococcal isolates

All *S. epidermidis* (n = 284), *E. faecalis* (n = 35) and *E. faecium* (n = 2) isolates were typed by random amplification of

polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in order to avoid duplication of isolates from the same host and to determine if a given genotype was shared by different individuals. RAPD profiles were obtained using primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') [34] as described by Ruíz-Barba et al. [30]. For PFGE genotyping, chromosomal DNA was digested with the endonuclease *Sma*I (New England Biolabs, Ipswich, MA) at 37 °C for 16 h. Then, electrophoresis was carried out in a CHEF DR-III apparatus (Bio-Rad) for 23 h at 14 °C at 6 V/cm with pulses from 5 to 50 s. A standard pattern (Lambda ladder PFG Marker, New England Biolabs) was included in the gels to compare the digitally normalized PFGE profiles. Computer-assisted analysis was performed with Phoretix 1D Pro software (Nonlinear USA, Inc., Durham, NC). Cluster analysis of PFGE pattern profiles was performed using the UPGMA method based on the Dice similarity coefficient.

#### 2.4. Characterization of the staphylococcal and enterococcal strains

Based on their different RAPD/PFGE profiles, 48 *S. epidermidis* isolates from 36 individuals were selected for further characterization. The presence of genes *embp*, *fbe* and *atlE* (associated with adhesion) and *icaD* (associated with biofilm formation) was evaluated using primer pairs described previously [5,10,23,35]. In the case of *fbe*, *atlE* and *icaD*, a multiplex PCR format was designed using the following conditions: 5 min at 94 °C followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and a final extension of 5 min at 72 °C. Conditions for amplification of the *embp* gene were 5 min at 94 °C for 1 cycle, followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 1 min at 58 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension step at 72 °C for 5 min.

Although *E. faecalis* isolates were isolated from the samples provided by 15 women, there were only eight RAPD genotypes among them. In contrast, two *E. faecium* genotypes were obtained from the two samples where this species was detected (one per sample). Then, 10 enterococci representing all different enterococcal RAPD profiles were selected for further assays. A multiplex PCR method was used to detect the presence of virulence determinants encoding sex pheromones (*ccf*, *cpd*, *cad*, *cob*), adhesins (*efaA<sub>fs</sub>*, *efaA<sub>fm</sub>*), and products involved in aggregation (*agg<sub>2</sub>*), biosynthesis of an extracellular metalloendopeptidase (*gelE*), biosynthesis of cytolysin (*cylA*) and immune evasion (*esp<sub>fs</sub>*). The primer couples used to detect the genes cited above were those proposed by Eaton and Gasson [7], using *E. faecalis* strains F4 (*efaA<sub>fs</sub><sup>+</sup> gelE<sup>+</sup> agg<sup>+</sup> cylMBA<sup>+</sup> esp<sup>+</sup> cpd<sup>+</sup> cob<sup>+</sup> ccf<sup>+</sup> cad<sup>+</sup>), P36 (*efaA<sub>fs</sub><sup>+</sup> gelE<sup>+</sup> agg<sup>+</sup> cylA<sup>+</sup> esp<sup>+</sup> cpd<sup>+</sup> cob<sup>+</sup> ccf<sup>+</sup> cad<sup>+</sup>) and P4 (*efaA<sub>fs</sub><sup>+</sup> gelE<sup>+</sup> agg<sup>+</sup> cylA<sup>+</sup> cpd<sup>+</sup> cob<sup>+</sup> ccf<sup>+</sup> cad<sup>+</sup>), and *E. faecium* P61 (*efaA<sub>fm</sub><sup>+</sup> esp<sup>+</sup>) [7] as control strains. PCR conditions were: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 51 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 1.5 min, and a final extension at 72 °C for 5 min.****

Presence of the *mecA* gene was evaluated in *S. epidermidis* isolates using primers *mecA* forward (5'-GGTCCCAT-TAACTCTGAAG-3') and *mecA* reverse (5'-AGTTCTG-CAGTACCGGATTTTGC-3'), which results in a 1040 bp

fragment, following the conditions described in a previous study [4]. The *mecA* gene is located in a mobile element in the staphylococcal chromosome, constituting the cassette SCC*mec*. The SCC*mec* element was submitted to a typing procedure previously described [36] based on PCR amplification of the *ccrB* gene followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using endonucleases *Hinf*I and *Bsm*I.

PCR reactions for *vanA* and *vanB* genes were performed as described previously [6,28]. Oligonucleotides used as primers for amplification of the 732 bp fragment of the *vanA* gene were VanA<sub>1</sub> (5'-GGGAAAACGACAATTGC-3') and VanA<sub>2</sub> (5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3'), while those used for amplification of the 1145 bp fragment of *vanB* were VanBfor (5'-GTGCTGCGAGATACCACAGA-3') and VanBrev (5'-CGAACACCATGCAACATTTC-3'). *E. faecium* BM4147 (resistant to vancomycin, VanA<sup>+</sup>) and *E. faecalis* V583 (resistant to vancomycin, VanB<sup>+</sup>) were used as positive controls. PCR assays for the detection of *vanD*, *vanE* and *vanG* genes in the enterococcal isolates was performed as previously described [8,22,26].

Hemolytic activity of *S. epidermidis* and enterococcal isolates was determined on Columbia agar supplemented with 5% horse blood (COH, BioMerieux). After an incubation of 72 h at 37 °C, plates were analyzed and the isolates were classified as non-hemolytic (no halo), moderately hemolytic (halo <1.5 mm) or strongly hemolytic (halo >1.5 mm). The ability of the *S. epidermidis* isolates to form biofilms was assessed using the Congo red agar assay (CRA) [24]. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and, then for an additional 24 h at room temperature. Isolates displaying black colonies are considered as positive, while those showing red colonies are negative.

The determination of the MIC (minimal inhibitory concentration) to several antibiotics was evaluated by a microdilution method using Sensititre plates Staenc1F (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH) following the manufacturer's instructions. Colonies from solid media were used to make a suspension equivalent to the 0.5 McFarland turbidity standard in saline solution and 50 µL of this suspension was transferred to a tube of Mueller–Hinton broth (bacterial concentration of ~6 log<sub>10</sub> CFU/ml). Aliquots (100 µl) of this suspension were inoculated into each Sensititre plate well. The antibiotics analyzed were: penicillin, ampicillin, amoxycillin–clavulanic acid, teicoplanin, chloramphenicol, erythromycin, mupirocin, streptomycin, gentamicin, clindamycin, oxacillin, ciprofloxacin, fosfomycin, imipenem, nitrofurantoin, trimethoprim–sulfamethoxazole, tetracycline, vancomycin, linezolid, quinupristin–dalfopristin and rifampin.

### 3. Results

#### 3.1. Bacterial counts in the colostrum samples

Samples of first colostrum were collected from 36 healthy women before breastfeeding started. Bacteria could be

isolated on all media with the exception of VRBA, a selective medium for the isolation of enterobacteria. The mean count values oscillated, depending on the sample, from 2.11 to 6.94 log CFU/ml in BHI, from 2.30 to 6.51 log CFU/ml in CNA, from 2.66 to 6.76 log CFU/ml in WCh, and from 2.30 to 6.50 log CFU/ml in MRS plates (Table 1). The results of initial comparisons using Pearson's product-moment correlation coefficients showed a strong positive significant correlation ( $r = 0.98$ ,  $P = 0.0000$ ) between bacterial counts in aerobically incubated culture media (BHI and CNA). Good correlation was also observed between bacterial counts obtained in WCh and MRS ( $r > 0.84$ ,  $P = 0.0000$ ) (Table 1). This means that, globally, the bacterial counts achieved by the samples in one of these media were similar to the values obtained in the rest of the culture media cited above.

### 3.2. Identification of the bacterial isolates

Identification of the isolates from the different growth media revealed that staphylococci were present in 33 of the 36 samples, with *S. epidermidis* being the predominant species, since it could be detected in 30 (83%) samples (Table 2). Enterococci were the second bacterial group and were isolated from 19 (~50%) samples. *E. faecalis* and *E. faecium* isolates were unambiguously detected in 15 and two samples, respectively (Table 2). Streptococci were the third bacterial group and were isolated from 11 (30.55%) samples. The dominant streptococcal species was *S. mitis*, which was present in nine samples. *Propionibacterium acnes* and *S. lugdunensis* were present in 22% of the samples. The less prevalent species included a few lactic acid bacteria, *Rothia mucilaginosa* and different Gram-negative species, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. or *Enterobacter* spp. Altogether, the number of species in the samples ranged from 1 to 8 (Table 2). RAPD and PFGE profiling revealed the existence of 48 different profiles among the *S. epidermidis* isolates, eight among the *E. faecalis* ones and two among the *E. faecium* ones (data not shown). One representative of each profile was selected for further characterization.

Table 1  
Descriptive statistics on bacterial counts ( $\log_{10}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) from colostrum samples in different culture media

	Culture media			
	BHI ( $n = 36$ )	CNA ( $n = 33$ )	WCh ( $n = 33$ )	MRS ( $n = 31$ )
Mean	4.22	4.28	4.49	4.14
Standard deviation	1.27	1.26	1.21	1.23
Minimum	2.11	2.30	2.66	2.30
Maximum	6.94	6.51	6.76	6.50
Pearson's correlation coefficient ( $r$ ):				
BHI		0.973*	0.914*	0.838*
CNA			0.913*	0.841*
WCh				0.849*

\*Statistically significant correlation ( $P = 0.000$ ).

Table 2

Prevalence of bacterial species isolated from the colostrum samples ( $n = 35$ )

Genus	Species	Number of positive samples (%)	Total number of isolates
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	30 (83.33)	284
	<i>S. lugdunensis</i>	8 (22.22)	23
	<i>S. hominis</i>	4 (11.11)	6
	<i>S. pasteurii</i>	3 (8.33)	3
	<i>S. capitis</i>	1 (2.77)	1
	<i>S. haemolyticus</i>	1 (2.77)	1
	<i>S. aureus</i>	2 (5.55)	3
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	15 (41.66)	35
	<i>E. faecium</i>	2 (5.55)	2
	<i>E. durans</i>	2 (5.55)	2
<i>Streptococcus</i>	<i>S. mitis</i>	9 (25.00)	27
	<i>S. oralis</i>	3 (8.33)	6
	<i>S. parasanguinis</i>	2 (5.55)	6
	<i>S. pneumoniae</i>	1 (2.77)	1
	<i>S. anginosus</i>	1 (2.77)	1
	<i>S. salivarius</i>	1 (2.77)	1
	<i>S. agalactiae</i>	1 (2.77)	1
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i>	8 (22.22)	11
	<i>P. avidum</i>	1 (2.77)	2
	<i>P. granulosum</i>	2 (5.55)	4
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>	4 (11.11)	4
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	1 (2.77)	2
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve</i>	1 (2.77)	1
<i>Actinomyces</i>	<i>A. neuii</i>	3 (8.33)	4
<i>Arthrobacter</i>	sp	1 (2.77)	1
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. amicolatum</i>	1 (2.77)	2
<i>Finegoldia</i>	<i>F. magna</i>	1 (2.77)	1
<i>Gemella</i>	<i>G. haemolysans</i>	2 (5.55)	2
<i>Rothia</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	4 (11.11)	5
<i>Enterobacter</i>	sp	2 (5.55)	4
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	2 (5.55)	2
<i>Klebsiella</i>	sp	1 (2.77)	2

### 3.3. Characterization of the staphylococcal and enterococcal strains

The 48 *S. epidermidis* strains were screened for potential virulence traits. Most of them contained the adhesin-encoding genes (*embp*, *fbe* and *atlE*) and only five strains did not have any of these four genes. The biofilm-related *icaD* gene was detected in 11 strains (23%) and, in general, there was a good correlation between the presence of such genes and results obtained using the CRA assay, which determines potential for biofilm production. Hemolytic activity could be detected in four isolates (Table 3).

The *mecA* gene was detected by PCR in six *S. epidermidis* isolates (12.5%) but only one of them showed oxacillin resistance (Table 3). Only two staphylococcal strains showed the simultaneous presence of *mecA* and *icaD*. The type of SCC<sub>mec</sub> was determined in the six *mecA*<sup>+</sup> strains. The *ccrB* gene could be amplified from all the *mecA*<sup>+</sup> strains and, on the basis of the *ccrB* restriction pattern with *HinfI* (type IV: 264, 227 and 154 bp; type III: 537 and 106 bp) or with *HinfI/BsmI* (type IV: 227, 171, 153 and 93 bp; type III: 320, 174, 106 and 44 bp), all were assigned to type IV (Table 3).

Most of the *S. epidermidis* strains (>90%) were sensitive to rifampin (1 µg/ml), imipenem (0.12 µg/ml), trimethoprim/sulfamethoxazole (MIC ≤2/38 µg/ml), quinupristin/dalfopristin





gastrointestinal tract. Some enterococcal strains have commercial applications as food starter cultures as well as probiotics in food and food supplements. On the other hand, enterococci are opportunistic pathogens that cause nosocomial infections in patients with underlying diseases and in neonates [12]. The incidence of virulence determinants and/or any other factor of clinical significance, such as the antibiotic resistance pattern or gene transfer potential, appears to be strain-specific [7,9]. In a recent study, Vancanneyt et al. [32] compared the genotypes of *E. faecium* strains from humans, animals and foods and found that all human isolates involved in infection fell into a well defined subgroup, which suggests that there may be a genetic basis for strains associated with human disease. Pillai et al. [27] have also suggested that virulent subpopulations of *E. faecalis* may exist. Therefore, the safety of any enterococcal strain must be individually evaluated. Resistance to glycopeptide antibiotics like vancomycin, which are frequently a last resort for treatment of nosocomial infections with multidrug-resistant pathogens, is a source of concern. However, enterococci not involved in infection are generally sensitive to clinically relevant antibiotics, including vancomycin [9,12], as was the case among the enterococci of this study.

In conclusion, this study indicated that colostrum contains a significant number of bacteria. The major species were negative for the virulence factors tested and were satisfactorily susceptible to antibiotics. We hypothesize that this biological fluid plays a key role in the initial colonization of the neonatal gut.

## Acknowledgements

This study was partly supported by the FUN-C-FOOD (Consolider-Ingenio 2010) and AGL2007-62042 projects from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

## References

- [1] Adlerberth, I., Lindberg, E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I.L., Wold, A.E. (2006) Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle. *Pediatric Res.* 59, 96–101.
- [2] Balmer, S.E., Wharton, B.A. (1989) Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch. Dis. Child* 64, 1672–1677.
- [3] Borderon, J.C., Lionnet, C., Rondeau, C., Suc, A.I., Laugier, J., Gold, F. (1996) Current aspects of fecal flora of the newborn without antibiotherapy during the first 7 days of life: enterobacteriaceae, enterococci, staphylococci. *Pathol. Biol.* 44, 416–422.
- [4] Cafiso, V., Campanile, F., Borbone, S., Caia, A., Cascone, C., Santagati, M., Stefani, S. (2001) Correlation between methicillin-resistance and resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infez. Med.* 2, 90–97.
- [5] Cafiso, V., Bertuccio, T., Santagati, M., Campanile, F., Amicosante, G., Perilli, M.G., Selan, L., Artini, M., et al. (2004) Presence of *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 1081–1088.
- [6] Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P. (1995) Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 24–27.
- [7] Eaton, T., Gasson, M.J. (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628–1635.
- [8] Fines, M., Perichon, B., Reynolds, P., Sahm, D.F., Courvalin, P. (1999) VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2161–2164.
- [9] Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A., Nuha, M.K.Y., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W.H. (2001) Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4385–4389.
- [10] Frebourg, N.B., Lefebvre, S., Baert, S., Lemeland, J.F. (2000) PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 38, 877–880.
- [11] Heikkilä, M.P., Saris, P.E.J. (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* 95, 471–478.
- [12] Kayser, F.H. (2004) Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 255–262.
- [13] Kullen, M.J., Sanozky-Dawes, R.B., Crowell, D.C., Klaenhammer, T.R. (2000) Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* 89, 511–516.
- [14] Lundquist, B., Nord, C.E., Winberg, J. (1985) The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle-fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatr. Scand.* 74, 45–51.
- [15] Martín, R., Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., Rodríguez, J.M. (2007) Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res. Microbiol.* 158, 31–37.
- [16] Martín, R., Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J.M. (2007) Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2638–2644.
- [17] Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143, 754–758.
- [18] Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. (2004) The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 121–127.
- [19] Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. (2005) Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J. Human Lact.* 21, 8–17.
- [20] Martineau, F., Picard, F.J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G. (2001) Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2541–2547.
- [21] Melchior, M.B., Vaarkamp, H., Fink-Gremmels, J. (2006) Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* 171, 398–407.
- [22] McKessar, S.J., Berry, A.M., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Paton, J.C. (2000) Genetic characterization of *vanG*. A novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3224–3228.
- [23] Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J.I., Pei, L., Lindberg, M., Guss, B. (1998) A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 66, 2666–2673.
- [24] Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., Vilela, C.L. (2006) Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* 118, 133–140.
- [25] Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E.J., et al. (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119, e724–e732.
- [26] Perichon, B., Reynolds, P., Courvalin, P. (1997) VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM 4339. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2016–2018.
- [27] Pillai, S.K., Sakoulas, G., Gold, H.S., Wennersten, C., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Inouye, R.T. (2002) Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2651–2652.



- [28] Ramos-Trujillo, E., Pérez-Roth, E., Méndez-Alvarez, S., Claverie-Martín, F. (2003) Multiplex PCR or simultaneous detection of enterococcal genes *vanA* and *vanB* and staphylococcal genes *mecA*, *ileS*-2 and *femB*. *Int. Microbiol.* 6, 113–115.
- [29] Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M. (2005) Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21, 131–137.
- [30] Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R. (2005) Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal. Biochem.* 347, 333–335.
- [31] Sakata, H., Yoshioka, H., Fujita, K. (1985) Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur. J. Pediatr.* 144, 186–190.
- [32] Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Björkroth, K.J., Franz, C.M., Foulquié Moreno, M.R., et al. (2002) Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1381–1391.
- [33] Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., Merckx, R., Rinders, B.J., Van Eldere, J. (2003) Reliability of the *ica*, *aap*, and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 114–119.
- [34] Veyrat, A., Miralles, M.C., Pérez-Martínez, G. (1999) A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J. Appl. Microbiol.* 87, 49–61.
- [35] Williams, R.J., Henderson, B., Sharp, L.J., Nair, S.P. (2002) Identification of a Fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 70, 6805–6810.
- [36] Yang, J.A., Park, D.W., Sohn, J.W., Kim, M.J. (2006) Novel PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for rapid typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. *J. Clin. Microbiol.* 44, 236–238.

**VI. *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*: UN RASGO DIFERENCIAL  
DE LA MICROBIOTA FECAL DE NIÑOS AMAMANTADOS**

**Artículo publicado en *BMC Microbiology***



Research article

Open Access

## ***Staphylococcus epidermidis*: A differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants**

Esther Jiménez<sup>1</sup>, Susana Delgado<sup>1</sup>, Antonio Maldonado<sup>1</sup>, Rebeca Arroyo<sup>1</sup>, Mar Albújar<sup>2</sup>, Natalia García<sup>2</sup>, Manel Jariod<sup>2</sup>, Leonides Fernández<sup>1</sup>, Adolfo Gómez<sup>2</sup> and Juan M Rodríguez\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain and <sup>2</sup>Servei de Pediatria, Hospital Universitari Joan XXIII, 43007, Tarragona, Spain

Email: Esther Jiménez - esjimene@vet.ucm.es; Susana Delgado - sdelgado@vet.ucm.es; Antonio Maldonado - maldonad@cica.es; Rebeca Arroyo - rebecca@vet.ucm.es; Mar Albújar - maralbujar@tiscali.es; Natalia García - nagarcia@tinet.org; Manel Jariod - mjariod.hj23.ics@gencat.net; Leonides Fernández - leonides@vet.ucm.es; Adolfo Gómez - gomezpapi@yahoo.es; Juan M Rodríguez\* - jmrodrig@vet.ucm.es

\* Corresponding author

Published: 10 September 2008

Received: 2 April 2008

BMC Microbiology 2008, 8:143 doi:10.1186/1471-2180-8-143

Accepted: 10 September 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/143>

© 2008 Jiménez et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### **Abstract**

**Background:** Breast milk is an important source of staphylococci and other bacterial groups to the infant gut. The objective of this work was to analyse the bacterial diversity in feces of breast-fed infants and to compare it with that of formula-fed ones. A total of 23 women and their respective infants (16 breast-fed and 7 formula-fed) participated in the study. The 16 women and their infants provided a sample of breast milk and feces, respectively, at days 7, 14, and 35. The samples were plated onto different culture media. Staphylococcal and enterococcal isolates were submitted to genetic profiling and to a characterization scheme, including detection of potential virulence traits and sensitivity to antibiotics.

**Results:** The feeding practice had a significant effect on bacterial counts. A total of 1,210 isolates (489 from milk, 531 from breast-fed and 190 from formula-fed infants) were identified. *Staphylococcus epidermidis* was the predominant species in milk and feces of breast-fed infants while it was less prevalent in those of formula fed-infants. *Enterococcus faecalis* was the second predominant bacterial species among the fecal samples provided by the breast-fed infants but it was also present in all the samples from the formula-fed ones. The biofilm-related *icaD* gene and the *mecA* gene were only detected in a low number of the *S. epidermidis* strains. Several enterococcal isolates were also characterized and none of them contained the *cylA* or the *vanABDEG* antibiotic-resistance genes. All were sensitive to vancomycin.

**Conclusion:** The presence of *S. epidermidis* is a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. Globally, the staphylococcal isolates obtained from milk and feces of breast-fed infants contain a low number of virulence determinants and are sensitive to most of the antibiotics tested.

## Background

Although the composition of the human intestinal microbiota is a major factor in the health status of both adults and infants, the process of initial colonization of the neonatal gut and the origin of the first colonizers are aspects that remain unclear.

Although the colonization pattern seems to be host-specific, this is generally accepted that, initially, the infant gut would contain facultative anaerobes which would create a reduced environment favourable to the establishment of obligate anaerobes, such as *Bacteroides*, *Clostridium* and *Bifidobacterium* species [1].

Traditionally, it has been widely accepted that the development of the gut microbiota starts at birth and is greatly influenced by the type of feeding [1-4]. The bacterial spectrum of breast-fed infants feces is narrower than that of formula-fed ones although, in the formers, the counts of fecal bifidobacteria and lactic acid bacteria are usually notably higher than those found in formula-fed infants [5,6]. Once weaning starts, differences between breast-fed and formula-fed infants disappear rapidly and the gut ecosystem evolves into a stable host-specific community predominated by obligate anaerobes [1].

Human milk is a major factor in the initiation and development of neonatal gut microbiota, not only because it contains prebiotic substances that promote the growth of selected bacterial groups in the infant gut [7], but also because this substrate represents a continuous source of microorganisms to the infant gut during several weeks after birth [8,9]. The presence of a few predominant bacterial species in breast milk [10] may explain why gut microbiota of breast-fed infants is composed of a narrow spectrum of species, and a more diverse microbiota develops only after weaning.

However, few studies on the factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy have had into account the influence of the bacteria naturally present in human milk [11]. Staphylococci, and particularly *Staphylococcus epidermidis*, seems to be the most predominant bacteria both in fresh and stored human milk [9,10], but paradoxically they have received a marginal attention regarding their role in the early colonization of the infant gut. Additionally, the few studies that report the detection of staphylococci in neonatal and infant feces are controversial since their presence has been rated from low [1] to high [12]. In this context, the objective of this study was to compare the bacterial diversity of breast milk, feces of breast-fed infants and feces of formula-fed ones by culture-based methods, with particular attention to those species belonging to the Genus *Staphylococcus*. Additionally, we investigated the role of breast milk as a source of

staphylococci to the infant gut and characterized the *S. epidermidis* strains isolated from the feces of the breast-fed infants. Finally, since enterococci seems to be another predominant bacterial group in the gut of both breast- and formula-fed infants, the characterization of the enterococcal strains isolated from infant feces constituted another objective of this study.

## Results

### Bacterial counts in fecal and milk samples

Inoculation of suitable dilutions of the different fecal samples (breast- or formula-fed 7-, 14-, or 35-day-old infants) led to bacterial growth in all the culture media tested. Globally, the values oscillated between 9.25 and 10.93 log<sub>10</sub> CFU/g (Table 1). A two-way ANOVA, with feeding practice and infant age as factors, revealed that the feeding practice had a significant effect on bacterial counts in infant feces (F-value = 10.11, P = 0.0045) but the influence of infant age was irrelevant. The mean bacterial counts in the feces of breast-fed infants were almost 1 log<sub>10</sub> CFU/g lower than the values corresponding to feces of the formula-fed ones as revealed by Duncan's test (Table 1). A second analysis with the culture medium used for enumeration and the feeding practice as factors in a two-way ANOVA showed important influence of the culture media (F-value = 11.09, P < 0.0001) on the fecal bacterial counts (Table 1). Aerobic bacterial counts (9.25 and 9.54 log<sub>10</sub> CFU/g obtained in CNA and VRBA media, respectively) were significantly lower than anaerobic bacterial counts (10.93 and 10.67 log<sub>10</sub> CFU/g obtained in WCh and MRS media, respectively). Mean bacterial counts on BHI medium had intermediate values. Furthermore, in this second analysis, the interaction between the culture medium employed and the feeding practice was also significant (F-value = 3.32, P = 0.0141), suggesting a differential influence of the feeding practice on the bacterial groups present in infant feces (Table 1).

A more detailed comparison of the mean bacterial counts in feces from breast-fed and formula-fed infants considering the results obtained in the different culture media for each infant age revealed significant differences (P < 0.05) in the bacterial counts corresponding to the culture media that were incubated aerobically (BHI, VRBA and CNA) for the samples obtained from 1- and 2-week old infants, but not after 5 weeks (Table 2). In contrast, no significant differences were observed on bacterial counts at any infant age assayed in those media (WCh and MRS) that were incubated anaerobically.

The average bacterial count in milk samples was 4.16 log<sub>10</sub> CFU/ml when they were inoculated in BHI, CNA, WCh and MRS media (Table 3). The CNA means decreased significantly (P = 0.031, Student's *t*-test) from day 7 to 35 (from 4.22 to 3.69 log<sub>10</sub> CFU/ml). In the rest of the media,

**Table 1: Effects and interactions of feeding practice and infant age or culture media used for enumeration on bacterial counts in infant feces, as determined by repeated measures two-way ANOVA**

Effect or interaction	DF	F value	Pr > F <sup>a</sup>	Duncan's grouping <sup>b</sup>	N	Group	Mean (log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup> )
Feeding practice	1	10.11	0.0045	A	215	Breast-fed	9.87
				B	105	Formula-fed	10.71
Infant age	2	0.18	0.8343	A	115	7-day old	10.16
				A	105	14-day old	10.16
				A	100	35-day old	10.12
Feeding practice × infant age	2	1.12	0.3360				
Feeding practice	1	10.18	0.0044	A	215	Breast-fed	9.87
				B	105	Formula-fed	10.71
Culture medium	4	11.09	< 0.0001	A	64	CNA	9.25
				A	64	VRBA	9.54
				B	64	BHI	10.34
				BC	64	MRS	10.67
				C	64	WCh	10.93
Feeding practice × culture medium	4	3.32	0.0141				

<sup>a</sup>Probability value F test: significant when  $P < 0.05$ .

<sup>b</sup>Duncan's tests: groups within the same effect with the same letter do not differ significantly ( $P < 0.05$ ).  
N = 320

there were no statistically significant differences between the mean bacterial counts through the period studied. When the samples were inoculated in VRBA agar, no colonies could be isolated in 9, 8 and 6 milk samples at days 7, 14 and 35, respectively (Table 3). Globally, VRBA bacterial growth was not detected in any of the three samples provided by 4 of the women that participated in the study. The mean of the VRBA in the rest of the samples oscillated between 4.42 and 4.80 log CFU/ml. A relationship ( $P < 0.070$ ) could be observed between the bacterial counts

from breast milk and from infant feces in CNA (weeks 1, 2 and 5), MRS (week 1) and WCh (week 1).

#### Identification of the isolates

A total of 721 isolates were randomly selected from CNA, BHI, MRS and WCh agar plates corresponding to feces of the breast-fed (531 isolates) and formula-fed (190 isolates) infants. Subsequently, they were identified by classical morphological and biochemical tests, species-specific PCR and/or 16S rDNA sequencing.

*S. epidermidis* was the predominant species in feces of breast-fed infants since it could be isolated from 86.05% of the samples (Table 4). In this group, a slight decrease in the number of *S. epidermidis* positive samples was observed from day 7 (16/14) to day 35 (9/13). In contrast, this species was only present in 13.33% of the samples obtained from formula-fed infants. The difference in the number of *S. epidermidis*-positive samples between breast- and formula-fed infants was statistically significant ( $P < 0.0001$ ). Presence of *S. aureus* and other *Staphylococcus* species was similar in both groups.

*Enterococcus faecalis* was the second Gram-positive bacterial species more widespread among the samples of the breast-fed group (53.49%). However, since it was present in 100% of the samples from the formula-fed one, there was a significant difference between both groups regarding this microorganism ( $P = 0.0011$ ). Other enterococcal species were also more widespread among feces of the formula-fed infants but the differences were not statistically different (Table 4). In contrast, streptococci could only be isolated from feces of breast-fed infants. The percentage of

**Table 2: Bacterial counts expressed as the mean log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> (SD) in feces of the breast-fed (n = 16) and formula-fed (n = 7) infants**

Medium	Week	Breast-fed infants	Formula-fed infants	P-value*
BHI	1	9.93 (0.95)	11.42 (0.68)	0.0078
	2	9.92 (0.51)	11.05 (0.39)	0.0001
	5	10.06 (1.01)	10.83 (0.80)	NS
VRBA	1	9.17 (1.07)	10.61 (1.09)	0.0415
	2	9.24 (0.93)	10.62 (0.09)	0.0011
	5	9.49 (1.35)	10.04 (0.70)	NS
CNA	1	9.20 (0.91)	10.66 (0.73)	0.0143
	2	9.08 (1.04)	10.46 (0.27)	0.0030
	5	8.52 (1.05)	9.74 (0.84)	NS
WCh	1	10.76 (0.91)	11.25 (0.97)	NS
	2	10.42 (0.99)	11.12 (0.20)	NS
	5	11.01 (0.55)	10.85 (0.51)	NS
MRS	1	10.51 (0.98)	10.83 (1.04)	NS
	2	10.22 (1.03)	10.61 (0.27)	NS
	5	10.57 (0.59)	10.51 (0.52)	NS

Statistical significance between the breast-fed group and the formula-fed group (Student's t-test). NS, not significant difference.

**Table 3: Bacterial counts expressed as the mean log<sub>10</sub> CFU/g (SD) from breast milk of the mothers that participated in the study**

Medium	Week 1 (n = 16)	Week 2 (n = 13)	Week 5 (n = 14)	F <sup>a</sup>
BHI	4.63 (0.89)	4.58 (1.44)	4.22 (1.08)	0.72
VRBA	ND <sup>b</sup> (n = 9)	ND (n = 8)	ND (n = 6)	-
	4.80 (1.35) (n = 7)	4.74 (1.21) (n = 5)	4.42 (0.91) (n = 8)	-
CNA	4.22 (0.55)	4.03 (0.85)	3.69 (0.62)	2.97
WCh	4.22 (0.67)	4.43 (0.86)	4.27 (1.20)	1.41
MRS	3.97 (0.70)	3.79 (0.96)	4.14 (1.22)	0.21

<sup>a</sup>F<sub>2,10</sub> value from a repeated measures ANOVA testing the effect of sampling occasion on bacterial counts of breast milk for each culture media used (p > 0.05)

<sup>b</sup>ND, not detected

samples containing other Gram-positive bacteria (including bifidobacteria) and Gram-negative bacteria was also significantly higher (P = 0.013 and 0.0008, respectively) in samples from breast-fed infants (Table 4).

Globally, 140 isolates (26.36%) from the breast-fed group were identified as *S. epidermidis*, 76 (14.31%) as *Bifidobacterium* sp. (*B. adolescentis*, *B. brevis*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. dentium*, and *B. angulatum*) and 69 (12.99%) as *E. faecalis* (Table 5). Interestingly, only 3 isolates (1.57%) from the formula-fed group belonged to the *S. epidermidis* species while other 3 isolates (1.57%) were identified as *Bifidobacterium* spp. In contrast, 84 isolates (44.21%) of this group were *E. faecalis* and this percentage increases to 52.63% when having into account all the enterococcal species identified (Table 4). A considerable percentage (31–35%) of isolates from both breast- and formula-fed infants was identified as Gram-negative bacteria although they belonged to a wide spectrum of species (Table 5).

All the milk samples contained *S. epidermidis* and, in general, the percentage of samples in which staphylococci,

enterococci and streptococci were isolated was more similar to that found among the feces of the breast-fed infants than to that achieved by feces of the formula-fed group (Table 5). A total of 489 breast milk isolates were randomly isolated and 304 (62.16%) were identified as *S. epidermidis* (Table 5). The rest of the bacterial groups found in feces of breast-fed infants were also detected in breast milk (Table 5). Streptococci were isolated from some samples of milk and feces of breast-fed infants but, in contrast, they could not be detected in feces of the formula-fed ones (Table 5).

#### Genotyping of the *S. epidermidis* isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

The 444 *S. epidermidis* isolates from feces of breast-fed infants and breast milk were genetically typified by the RAPD technique and the analysis of the profiles revealed the existence of 51 different genotypes. A representative of each RAPD profile was selected for further characterization. In addition, comparison of the RAPD profiles of fecal *S. epidermidis* with those obtained from breast milk isolates revealed that the same strain was shared by milk

**Table 4: Bacteria detected in the samples of breast milk and feces of the breast- and formula-fed infants and percentage of samples in which they were detected**

Microorganism	Milk	Feces		P-value <sup>a</sup>
		Breast-fed infants	Formula-fed infants	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100.00%	86.05%	13.33%	< 0.0001
<i>Staphylococcus aureus</i>	16.28%	16.28%	13.33%	NS <sup>b</sup>
Other <i>Staphylococcus</i> spp.	16.28%	6.98%	6.67%	NS
<i>Enterococcus faecalis</i>	20.93%	53.49%	100.00%	0.0011
<i>Enterococcus faecium</i>	ND <sup>c</sup>	2.33%	13.33%	NS
Other <i>Enterococcus</i> spp.	4.65%	9.30%	26.67%	NS
<i>Streptococcus</i> spp.	27.91%	13.95%	ND	NS
Other Gram-positive bacteria	20.93%	69.77%	33.33%	0.0130
Gram-negative bacteria	46.51%	97.62%	66.67%	0.0008

<sup>a</sup>Statistical significance between the breast-fed group and the formula-fed group ( $\chi^2$  test).

<sup>b</sup>NS, not significant (P > 0.05).

<sup>c</sup>ND, not detected.

**Table 5: Identification of the colonies isolated from breast milk and feces from breast- and formula-fed infants**

Microorganisms	Milk N° colonies (%)	Breast-fed infants N° colonies (%)	Formula-fed infants N° colonies (%)
<b>1. Gram-positive bacteria:</b>			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	304 (62.16)	140 (26.36)	3 (1.57)
Other staphylococci	24 (4.91)	21 (3.95)	3 (1.57)
<i>Enterococcus faecalis</i>	21 (4.29)	69 (12.99)	84 (44.21)
Other enterococci	1 (0.20)	6 (1.12)	16 (8.42)
<i>Streptococcus</i> spp.	35 (7.15)	17 (3.20)	ND <sup>a</sup>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4 (0.81)	74 (13.93)	3 (1.58)
<i>Lactobacillus</i> spp.	2 (0.40)	6 (1.13)	15 (7.89)
Other Gram-positive bacteria <sup>b</sup>	22 (4.49)	31 (5.83)	ND
<b>2. Gram-negative bacteria:</b>			
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	5 (1.03)	ND	ND
<i>Bacteroides</i> spp.	ND	6 (1.13)	2 (1.05)
<i>Burkholderia</i> spp.	2 (0.40)	5 (0.95)	ND
<i>Citrobacter</i> spp.	7 (1.44)	4 (0.75)	5 (2.63)
<i>Escherichia coli</i>	37 (7.56)	94 (17.70)	50 (26.32)
<i>Klebsiella</i> spp.	7 (1.44)	23 (4.33)	3 (1.58)
<i>Pantoea agglomerans</i>	ND	ND	2 (1.05)
<i>Enterobacter</i> spp.	7 (1.44)	30 (5.64)	4 (2.10)
Other Gram-negative bacteria <sup>c</sup>	11 (2.25)	5 (0.95)	ND
<b>Total number of colonies identified</b>	<b>489</b>	<b>531</b>	<b>190</b>

<sup>a</sup>ND, not detected; <sup>b</sup>Other Gram-positive bacteria: *Actinomyces* spp., *Kocuria* spp., *Propionibacterium* spp.; <sup>c</sup>Other Gram-negative bacteria: *Kluyvera cryocrescens*, *Pseudomonas* spp., *Shigella* spp.

and infant feces in 12 of the 16 mother-infant pairs [see additional file 1].

### Characterization of the *S. epidermidis* strains

The 51 *S. epidermidis* strains were screened for the presence of potential virulence traits [see additional file 1]. In relation to adhesin-encoding genes, a multiplex PCR assay revealed the presence of the genes *embp* and *atlE* in all the strains. In contrast the *fbe* gene could be detected in only 13 strains (25%). The biofilm-related *icaD* gene was detected in 11 strains (20%) and, in general, there was a good correlation between the presence of such gene and the results obtained using the CRA assay, which determines potential for biofilm production. Hemolytic activity could not be detected among the assayed strains.

Among the 17 strains showing oxacillin resistance, the *mecA* gene could be detected by PCR in 9 (53%). In contrast, *mecA* amplification was obtained from 6 oxacillin-sensitive strain. Only 3 strains showed the simultaneous presence of *mecA* and *icaD* [see additional file 1]. The type of SCC *mec* was determined in all the *mecA*<sup>+</sup> strains. The *ccrB* gene could be amplified from all the *mecA*<sup>+</sup> strains and, on the basis of the *ccrB* restriction pattern with *HinfI* (type IV: 264, 227 and 154 pb; type III: 537 and 106 bp) or with *HinfI/BsmI* (type IV: 227, 171, 153 and 93 bp; type III: 320, 174, 106 and 44 bp), all were assigned to type IV,

which is generally carried by community-acquired staphylococci.

The determination of the MIC's of 21 antibiotics or antibiotics mixtures for the 51 *S. epidermidis* strains revealed that all of them were sensitive to the lower concentration of nitrofurantoin (32 µg/ml), vancomycin (≤ 2 µg/ml; with one exception) and rifampin (1 µg/ml; with two exceptions), while the results against the rest of antibiotics were variable depending on the strain [see additional file 2]. Independently of their origin, most of the strains were sensitive to quinupristin/dalfopristin (≤ 0.25 µg/ml), trimethoprim/sulfamethoxazole (MIC < 2/38 µg/ml), gentamicin (≤ 2 µg/ml), linezolid (≤ 2 µg/ml), fosfomicin (≤ 16 µg/ml), ciprofloxacin (≤ 0.5 µg/ml), chloramphenicol (≤ 16 µg/ml), ampicillin (≤ 4 µg/ml) and teicoplanin (≤ 1 µg/ml). The percentage of susceptible strains was lower for imipenem (≤ 0.12 µg/ml), penicillin (≤ 4 µg/ml), and tetracycline (≤ 8 µg/ml).

### Characterization of the *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains

None of the 4 *E. faecium* strains tested have the presence of any virulence determinant (*ccf*, *cpd*, *cad*, *cob*, *efaA<sub>fs</sub>*, *efaA<sub>fm</sub>*, *agg2*, *gelE*, *cylA*, *eps<sub>fs</sub>*) while all the *E. faecalis* isolates tested possessed some potential virulence determinants [see additional file 3]. All the sex pheromone determinants were detected in 19 *E. faecalis* strains but the gene



encoding cytolysin (*cylA*) could only be detected in 7 strains. The results for the rest of the enterococcal genes were variable depending on the strains [see additional file 3].

All the *E. faecium* and *E. faecalis* strains were susceptible to low concentrations of penicillin, ampicillin, ciprofloxacin, fosfomycin, nitrofurantoin, tetracycline, erythromycin, vancomycin, teicoplanin, chloramphenicol and rifampicin [see additional file 4]. The percentage of strains resistant to quinupristin/dalfoprisin ( $\text{MIC} \geq 4 \mu\text{g/ml}$ ) was 79.31% while 34.48% of them showed resistance to streptomycin ( $\text{MIC} > 1000 \mu\text{g/ml}$ ). Only one strain was resistant to gentamycin ( $\text{MIC} > 500 \mu\text{g/ml}$ ) and only another one to linezolid ( $\text{MIC} \geq 8 \mu\text{g/ml}$ ) [see additional file 4].

## Discussion

Colostrum and milk play key roles in the initiation, development and composition of the infant gut microbiota since they contain a variety of factors, such as immunoglobulins, immunocompetent cells, fatty acids, polyamines, oligosaccharides, lysozyme, lactoferrin, and antimicrobial peptides, that modulate bacterial growth in the intestinal ecosystem. In addition, breast milk is an important and continuous source of commensal bacteria, including staphylococci, streptococci, and lactic acid bacteria, to the infant gut [8-10]. Therefore, it is not strange that the bacterial composition of the faecal flora of the breast-fed infant reflects the bacterial composition of breast milk [9].

In this work, *S. epidermidis* was the predominant species in milk of the lactating women and in the feces of their respective infants while it was almost absent in samples from feces of formula-fed infants. Previously, different studies have reported that this bacterial species is the predominant one in human milk from healthy women [9,10]. In contrast, *E. faecalis* was the dominant species among the isolates obtained from feces of formula-fed infants. Similarly, a molecular analysis revealed that *E. faecalis* was present in feces of a formula-fed infant on the sixth day of life but, in contrast, *S. epidermidis* could not be detected [13]. It has been suggested that the major differences between the microbiological composition of human milk and infant formula are probably the main factor responsible for the differences observed between the gut microbiota of breast- and formula-fed infants [1-4,14]. Other bacterial groups, such as lactobacilli were less prevalent and this fact may be due to their lower presence or to the fact that their isolation is difficult with the culture media used in this study.

Interestingly, the same *S. epidermidis* strain (as determined by genetic profiling) was isolated from milk and feces of

several each mother-infant pairs. In the last years, it has been shown that breast milk plays an important role in the vertical mother-to-child transmission of lactic acid bacteria [5,8,15,16]. In this context, our results indicate that an abundant presence of *S. epidermidis* in the infant gut is a differential feature of the feces of breast-fed infants when compared to those of formula-fed infants.

Studies carried 20 years ago already described that staphylococci were common in feces of breast-fed infants [12,17,18]. More recently, it has been shown that coagulase-negative staphylococci colonized 100% of breast-fed Western infants from day 3 onwards [19]. Such staphylococci colonized vaginally and cesarean section-delivered infants equally early. Some authors suggest that, in fact, staphylococcal colonization of the infant gut has increased from the 70s to the present [19,20]. It has been speculated that this may be an effect of a highly hygienic lifestyle which leads to a delayed acquisition of "traditional" fecal bacteria, such as enterobacteria [19]. In their absence, staphylococci become the first gut colonizers and the results of our work suggest that breast milk could be the main source. Then, the population decreased significantly from 4 week until 6 month of age. Similarly, in our study the number of samples from breast-fed infants in which *S. epidermidis* could be isolated decreased from week 1 to week 5.

The different *S. epidermidis* strains isolated from feces of the breast-fed infants were submitted to a characterization scheme that included the detection of virulence-associated determinants and the profile of antibiotic resistances in order to confirm the prevalence of non-pathogenic isolates in the healthy infant gut. Among the *S. epidermidis* strains analyzed, the presence of adhesion-related genes was very high, independently of the sample from which they were isolated. All of them carried the *embp* and *atlE* genes and 25% of the strains harbored the *fbe* gene. The cell surface proteins may help to explain the high prevalence of *S. epidermidis* in breast milk since they could contribute to the bacterial attachment to the mammary areola and ducts throughout the lactation period. In contrast, the percentage of strains carrying the biofilm-related *ica* operon was much lower (20%). A potential relationship between *S. epidermidis* infection and the presence of such operon has been reported [21]. In fact, biofilm formation has been described in many cases of staphylococcal mastitis and this is the reason why such property is considered as a potential virulence factor [22]. A few strains showed methicillin resistance but methicillin-resistant staphylococci are being reported with increasing frequency in the community and they are commonly isolated from healthy hosts [23]. Globally, most of the *S. epidermidis* strains characterized in this study harbour several adhesion factors but not antibiotic resistance or virulence determi-

nants. Since staphylococcal strains provided first by colostrum and, later, by breast milk may successfully compete with potentially pathogenic strains found in the hospital environment, their application as probiotics in neonatal units could be considered in the future if works in progress (including complete genome sequencing and analysis) confirm the safety of selected strains.

Enterococci, and particularly *E. faecium* and *E. faecalis*, become normal components of the human gastro-intestinal soon after birth. On the other hand, enterococci are opportunistic pathogens that may cause nosocomial infections in neonates suffering underlying diseases [24]. However, the presence of virulence determinants and the antibiotic resistance pattern appears to be strain-specific among isolates studied so far [25,26]. In fact, it seems that human isolates involved in clinical infection fell into a well defined subgroup, which suggest that there may be a genetic basis for strains associated with human disease [27,28]. In addition, enterococci not involved in human clinical infection are generally sensitive to clinically relevant antibiotics, including vancomycin [24,26], as happened with the enterococcal strains analyzed in this work.

## Conclusion

Our results indicate that the feeding practice (breast- or formula feeding) had a significant effect on bacterial counts and fecal microbiota composition. *S. epidermidis* is the most prevalent species in feces of breast-fed infants while it is practically absent in those of formula fed-infants. Therefore, *S. epidermidis* can be considered as a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants although this finding requires further confirmation in larger studies. The staphylococcal isolates only contain a low number of virulence determinants and are sensitive to most of the antibiotics tested. Additionally, we have observed that *E. faecalis* is the second bacterial species in feces of the breast-fed group but it is also present in all the samples from the formula-fed one. The characterization of several representative enterococcal isolates revealed that none of them were resistant to vancomycin. Streptococci were isolated from some samples of milk and feces of breast-fed infants but, in contrast, they could not be detected in feces of the formula-fed ones.

## Methods

### Subjects and sampling

A total of 23 women and their respective infants participated in the study and they were enrolled according with the following criteria: (a) healthy women without present or past underlying conditions; (b) normal full-term pregnancy; (c) vaginal delivery; and (d) absence of infant and/or maternal perinatal problems, including mastitis. Among the 23 women, 16 breast-fed their infants while the remaining 7 voluntarily choose a commercial formula

devoid of prebiotics to feed their infants despite they were advised of the benefits of breastfeeding. The assessment of sample size for both groups of infants (breast-fed and formula-fed) was based on an estimated large effect size of the feeding practice on the infant gut microbiota (0.8 log units of difference in the mean values of bacterial counts), with an  $\alpha$  at 0.05 and a statistical power of 83% in a variance analysis of repeated measures. All volunteers gave written informed consent to the protocol, which was approved by the Ethical Committee of Hospital Joan XXIII (Tarragona, Spain). The participants provided a sample of breast milk (breastfeeding group) and infant feces at days 7, 14, and 35 after birth. All the samples were collected in sterile tubes as previously described [10] and kept at 4 °C until delivery to the laboratory.

### Isolation and enumeration of bacteria

Proper peptone water dilutions of the milk and feces samples were plated in triplicate onto Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK; a general-purpose medium suitable for the cultivation of non-fastidious bacteria, yeasts and moulds), Violet Red Bile Agar (VRBA; Difco, Detroit, MI; a selective medium for the isolation of enterobacteria) and Columbia Nalidixic Acid Agar (CNA, BioMerieux; a highly nutritious, general-purpose medium for the isolation and cultivation of fastidious microorganisms) agar plates, which were aerobically incubated at 37 °C for 24 h. Parallel, the same samples were also cultured on Wilkins-Chalgren (WCh, Oxoid; a general medium for isolating anaerobic bacteria) and de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS, Oxoid; a medium for the isolation of lactic acid bacteria and bifidobacteria) agar plates, which were incubated anaerobically (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (MINI-MACS, DW Scientific, Shipley, UK) at 37 °C for 48 h. Between 5–10 isolates from each culture medium where growth was observed (~35 isolates per sample and week) were randomly selected, grown in BHI broth and stored at -80 °C in the presence of glycerol (30%, v/v).

### Identification of the bacterial isolates

The selected isolates were observed by optical microscopy to determine their morphology and Gram staining. Additionally, they were tested for catalase, oxidase and coagulase activities and for growth on plates of Baird-Parker (BP, BioMerieux) and Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA, Oxoid). All the isolates corresponding to samples (milk/feces) obtained at weeks 1, 2 and 5 were identified to the species level. Initially, most of the isolates that, on the basis of such preliminary tests, seemed to belong to the genus *Staphylococcus* were identified as *S. epidermidis*, *S. aureus* or *S. hominis* by a novel multiplex PCR method based on the *dnaJ* genes. Briefly, a single colony growing on solid media was removed with a sterile plastic tip and

resuspended in 100 µl of sterile deionized water in a microcentrifuge tube. Then 100 µl of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) was added to the suspensions, and after vortexing for 5 s the mixture was centrifuged at 16,000 × g for 5 min at 4°C. Then 5–10 µl of the upper aqueous phase was used as a source of DNA template for PCR with primers J-StGen (5'-TGGCCAAAAGAGACTATTATGA-3'), J-StAur (5'-GGATCTCTTTGTCTGCCG-3'), J-StEpi (5'-CCACCAAAGCCTTGACTT-3') and J-StHom (5'-TTGACCACTACCCTCACAC-3') in a Icyder thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The primer pairs J-StGen/J-StAur, J-StGen/J-StEpi and J-StGen/J-StHom result in a 337 bp *S. aureus* species-specific fragment, 249 bp *S. epidermidis* species-specific fragment and a 589 bp *S. hominis* species-specific fragment, respectively. PCR conditions were as follows: 1 cycle of 94°C for 4 min, 30 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec, and a final extension of 72°C for 5 min. On the other hand, most of the isolates that seemed to belong to the genus *Enterococcus* could be identified by PCR species-specific detection of enterococcal *ddl* genes, which encode D-alanine:D-alanine ligases, following the protocol described by Dutka-Malen et al. [29]. Confirmation of staphylococci and enterococci identification and identification of the rest of the isolates was performed by PCR sequencing of a 470 pb fragment of the 16S rRNA gene as described by Kullen et al. [30]. The amplicons were purified using the Nucleospin® Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Unit of the Universidad Complutense de Madrid, Spain. The resulting sequences were used to search sequences deposited in the EMBL database using BLAST algorithm and the identity of the isolates was determined on the basis of the highest scores (> 98%).

#### **Genotyping of the *S. epidermidis*, *E. faecium* and *E. faecalis* isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)**

The *S. epidermidis*, *E. faecium* and *E. faecalis* isolates were typified by RAPD. DNA was extracted from isolated colonies following the protocol of Ruiz-Barba et al. [31] and was used as a template to determine the RAPD profile with the primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') [32]. This technique was also used to compare *S. epidermidis* isolates obtained from breast milk and infant feces of the different mother-infant pairs in order to know if there may be a vertical mother-to-child transmission of this species.

#### **Screening for potential virulence determinants, *mecA*, *SSCmec* and antibiotic susceptibility among the *S. epidermidis* isolates**

Based on their different RAPD, 51 *S. epidermidis* strains were selected for further studies. Presence of genes *embp*, *fbe* and *atlE* (which products are involved in adhesion) and *icaD* (involved in biofilm formation), was evaluated

using primers couples described previously [33–36]. In the case of *fbe*, *atlE* and *icaD*, a novel multiplex PCR format was designed using the following conditions: 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min and, then, a final extension of 5 min at 72°C. On the other hand, conditions for amplification of the *embp* gene were as follows: 5 min at 94°C for 1 cycle followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 58°C, 1 min at 72°C, and a final extension step at 72°C for 5 min. The hemolytic activity of the isolates was determined on Columbia agar supplemented with 5% horse blood (COH, BioMerieux). After an incubation of 72 h at 37°C, the plates were analyzed and the isolates were classified as non hemolytic (no halo), moderately hemolytic (halo < 1.5 mm) or strongly hemolytic (halo > 1.5 mm). The ability of the *S. epidermidis* isolates to form biofilms was assessed using the Congo Red agar assay (CRA) [37]. Presence of the *mecA* gene, conferring methicillin-resistance, was evaluated in *S. epidermidis* isolates following the protocol described in a previous study [38]. The *mecA* gene is located in a mobile element in the staphylococcal chromosome, constituting the cassette SCC *mec*. The SCC *mec* element was submitted to a typing procedure previously described [39], which is based on the PCR amplification of the *ccrB* gene followed by a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using endonucleases *HinfI* and *BsmI*.

The determination of the MICs to several antibiotics was evaluated by a microdilution method using the Sensititre plates Staenc1F (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH) following the manufacturer's instructions. The antibiotics analyzed were: penicillin, ampicillin, amoxycillin-clavulanic acid, teicoplanin, chloramphenicol, erythromycin, mupirocin, streptomycin, gentamicin, clindamycin, oxacillin, ciprofloxacin, fosfomycin, imipenem, nitrofurantoin, trimethoprim-sufamethoxazole, tetracycline, vancomycin, linezolid, quinupristin-dalfopristin and rifampin.

#### **Screening for potential virulence determinants, van genes and antibiotic susceptibility among the enterococcal isolates**

Similarly, 25 *E. faecalis* and 4 *E. faecium* strains (one representative of each of the RAPD group found in this study) were further characterized. A novel multiplex PCR method was used to detect the presence of virulence determinants encoding sex pheromones (*ccf*, *cpd*, *cad*, *cob*), adhesins (*efaA<sub>fs</sub>*, *efaA<sub>fm</sub>*) and products involved in aggregation (*agg<sub>2</sub>*), biosynthesis of an extracellular metalloendopeptidase (*gelE*), biosynthesis of cytolysin (*cylA*) and immune evasion (*eps<sub>fs</sub>*). The primers couples and PCR conditions used to detect all the genes cited above were those proposed by Eaton and Gasson [25]. Control strains used in PCR experiments were *E. faecalis* strains F4 (*efaA<sub>fs</sub>*<sup>+</sup>

*gelE*<sup>+</sup> *agg*<sup>+</sup> *cylMBA*<sup>+</sup> *esp*<sup>+</sup> *cpd*<sup>+</sup> *cob*<sup>+</sup> *ccf*<sup>+</sup> *cad*<sup>+</sup>), P36 (*efaA<sub>fs</sub>*<sup>+</sup> *gelE*<sup>+</sup> *agg*<sup>+</sup> *cylA*<sup>+</sup> *esp*<sup>+</sup> *cpd*<sup>+</sup> *cob*<sup>+</sup> *ccf*<sup>+</sup> *cad*<sup>+</sup>) and P4 (*efaA<sub>fs</sub>*<sup>+</sup> *gelE*<sup>+</sup> *agg*<sup>+</sup> *cylA*<sup>+</sup> *cpd*<sup>+</sup> *cob*<sup>+</sup> *ccf*<sup>+</sup> *cad*<sup>+</sup>), and *E. faecium* P61 (*efaA<sub>fm</sub>*<sup>+</sup> *esp*<sup>+</sup>) [25]. The hemolytic activity of the isolates and their ability to form biofilms were assessed exactly as described for the staphylococcal isolates.

PCR reactions for *vanA* and *vanB* genes were prepared as described Dutka-Malen et al. [29] and Ramos-Trujillo et al. [40], respectively. *E. faecium* BM4147 (resistant to vancomycin, VanA<sup>+</sup>) and *E. faecalis* V583 (resistant to vancomycin, VanB<sup>+</sup>) were used as positive controls. Detection of *vanD*, *vanE* and *vanG* genes in the *E. faecalis* isolates was performed as previously described [41-43]. The determination of the MICs to several antibiotics was evaluated by the microdilution method cited for the staphylococcal isolates.

### Statistical analysis

Microbiological data, recorded as colony forming units (CFU) per gram of feces, or milliliter of milk, were transformed to logarithmic values before statistical analysis. The reported values of bacterial counts are the mean values of duplicate or triplicate determinations and the standard deviation (SD) of the mean. Bacterial counts in feces samples were analyzed by two-way ANOVA for repeated measures using the General Lineal Model procedure to determine the effect of feeding practice (breast feeding and formula feeding) and infant age (days 7, 14, and 35 after birth) or culture media used for enumeration of bacterial counts (BHI, VRBA, CNA, WCh, and MRS) and their interaction. The two-way ANOVA was followed by Duncan's multiple range tests ( $\alpha = 0.05$ ). A one-way repeated measures ANOVA was used to test for differences amongst the means of bacterial counts from breast milk for each culture media used with sampling occasion as repeated measures variable. The statistical software package SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for these analysis.

Student's *t*-tests were applied to determine statistically significant differences between the bacterial counts in feces of breast-fed and formula-fed infants at each infant age and for each culture media used for enumeration of bacterial counts. Comparison of bacterial counts in breast milk obtained at different sampling times (1, 2, and 5 weeks) was made also using Student's *t*-tests. Two-sided probability (P) values  $\geq 0.05$  were considered non significant. Identified bacterial isolates from infant feces were analyzed to evaluate the association between the presence of a specific kind of bacteria in the fecal samples and the feeding practice using a  $\chi^2$  tests and a significance level of  $P < 0.05$ .

The Pearson's product-moment correlation was used to assess the association between bacterial counts in breast milk and in infant feces for each medium and sampling time. Student's *t*-tests,  $\chi^2$  tests and Pearson's test were carried out with the Statgraphics Plus 5.0 software (Manugistics, Inc., Rockville, Md.).

### Authors' contributions

EJ and SD carried out the microbiological analysis of the samples, AM designed the primers and PCR conditions. RA assisted in the preparation of material and participated in the identification of the isolates. MA and NG collected the samples and the epidemiological data. MJ and LF participated in the design of the study and performed the statistical analysis. AG coordinated the enrolment of the volunteers and the collection of the samples, participated in the design of the study and revised the manuscript. JMR conceived of the study, coordinated it and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Additional material

#### Additional file 1

Analysis of the *S. epidermidis* strains. A table showing the presence of potential virulence determinants and other traits among the 51 *S. epidermidis* strains.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2180-8-143-S1.pdf>]

#### Additional file 2

Resistance to different antibiotics among the *S. epidermidis* strains. A table showing MIC distribution and percentage of resistance to different antibiotics among the *S. epidermidis* strains.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2180-8-143-S2.pdf>]

#### Additional file 3

Analysis of the enterococcal strains. A table showing the presence of potential virulence determinants and other traits among the enterococcal strains.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2180-8-143-S3.pdf>]

#### Additional file 4

Resistance to different antibiotics among the enterococcal strains. A table showing MIC distribution and percentage of resistance to different antibiotics among the enterococcal strains.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2180-8-143-S4.pdf>]

## Acknowledgements

This work was supported by the FUN-C-FOOD (Consolider-Ingenio 2010) and AGL2007-62042 projects from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

## References

- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR: **Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract.** *Am J Clin Nutr* 1999, **69**:1035S-1045S.
- Yoshioka H, Iseki K, Fugita K: **Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants.** *Pediatrics* 1983, **72**:317-321.
- Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T: **The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants.** *Microbiol Immunol* 1984, **28**:975-986.
- Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klein N, Bondels JG, Welling GVV: **Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000, **30**:61-67.
- Ahrné S, Lönnemark E, Wold AE, Berg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Molin G, Adlerberth I: **Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants.** *Microbes Infect* 2005, **7**:1256-1262.
- Rinne MM, Gueimonde M, Kalliomäki M, Hoppu U, Salminen SJ, Isolauri E: **Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005, **43**:59-65.
- Boehm G, Stahl B, Jelinek J, Knol J, Miniello V, Moro GE: **Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas.** *Acta Paediatr Suppl* 2005, **94**:18-21.
- Martin R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM: **Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut.** *J Pediatr* 2003, **143**:754-758.
- Heikkilä MP, Saris PEJ: **Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk.** *J Appl Microbiol* 2003, **95**:471-478.
- Martin R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jimenez E, Fernandez L, Smidt H, Rodríguez JM: **Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women.** *Res Microbiol* 2007, **158**:31-37.
- Grönlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S, Isolauri E: **Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease.** *Clin Exp Allergy* 2007, **37**:1764-1772.
- Sakata H, Yoshioka H, Fujita K: **Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns.** *Eur J Pediatr* 1985, **144**:186-190.
- Park HK, Shim SS, Kim SY, Park JH, Park SE, Kim HJ, Kang BC, Kim CM: **Molecular analysis of colonized bacteria in human newborn infant gut.** *J Microbiol* 2005, **43**:345-353.
- Favier CF, Vaughan EE, de Vos W, Akkermans A: **Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:219-226.
- Matsumiya Y, Kato N, Watanabe K, Kato H: **Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction.** *J Infect Chemother* 2002, **8**:43-49.
- Martin R, Jiménez E, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM: ***Lactobacillus salivarius* CECT a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair.** *Int J Food Microbiol* 2007, **112**:35-43.
- Lundequist B, Nord CE, Winberg J: **The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle-fed infants from birth to eight weeks.** *Acta Paediatr Scand* 1985, **74**:45-51.
- Balmer SE, Wharton BA: **Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula.** *Arch Dis Child* 1989, **64**:1672-1677.
- Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Wold AE: **Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle.** *Pediatric Res* 2006, **59**:96-101.
- Borderon JC, Lionnet C, Rondeau C, Suc AI, Laugier J, Gold F: **Current aspects of fecal flora of the newborn without antibiotic therapy during the first 7 days of life: *Enterobacteriaceae*, *enterococci*, *staphylococci*.** *Pathol Biol* 1996, **44**:416-422.
- Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Rinders BJ, Van Eldere J: **Reliability of the *ica*, *aap*, and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections.** *Clin Microbiol Infect* 2003, **9**:114-119.
- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J: **Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?** *Vet J* 2006, **171**:398-407.
- Oliveira DC, Milheirico C, Vinga S, de Lencastre H: **Assessment of allelic variation in the *ccrAB* locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **58**:23-30.
- Kayser FH: **Safety aspects of enterococci from the medical point of view.** *Int J Food Microbiol* 2004, **88**:255-262.
- Eaton T, Gasson MJ: **Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:1628-1635.
- Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH: **Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:4385-4389.
- Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Björkroth KJ, Franz CM, Foulquié Moreno MR, Revets H, De Vuyst L, Swings J, Kersters K, Dellaglio F, Holzapfel WH: **Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:1381-1391.
- Pillai SK, Sakoulas G, Gold HS, Wennersten C, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Inouye RT: **Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:2651-2652.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P: **Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR.** *J Clin Microbiol* 1995, **33**:24-27.
- Kullen MJ, Sanosky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR: **Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex.** *J Appl Microbiol* 2000, **89**:511-516.
- Ruiz-Barba JL, Maldonado A, Jiménez-Díaz R: **Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications.** *Anal Biochem* 2005, **347**:333-335.
- Rodas A, Ferrer S, Pardo I: **Poliphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, **55**:197-207.
- Williams RJ, Henderson B, Sharp LJ, Nair SP: **Identification of a Fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*.** *Infect Immun* 2002, **70**:6805-6810.
- Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M, Guss B: **A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*.** *Infect Immun* 1998, **66**:2666-2673.
- Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF: **PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(2):877-880.
- Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Artini M, Nicoletti G, Stefani S: **Presence of *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production.** *Clin Microbiol Infect* 2004, **10**:1081-1088.
- Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL: **Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates.** *Vet Microbiol* 2006, **118**:133-140.
- Cafiso V, Campanile F, Borbone S, Caia A, Cascone C, Santagati M, Stefani S: **Correlation between methicillin-resistance and resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*.** *Infez Med* 2001, **9**(2):90-97.
- Yang JA, Park DW, Sohn JW, Kim MJ: **Novel PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for rapid typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:236-238.

40. Ramos-Trujillo E, Pérez-Roth E, Méndez-Alvarez S, Claverie-Martín F: **Multiplex PCR or simultaneous detection of enterococcal genes *vanA* and *vanB* and staphylococcal genes *mecA*, *ileS-2* and *femB*.** *Int Microbiol* 2003, **6**:113-115.
41. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P: **VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM 4339.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**:2016-2018.
42. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P: **VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:2161-2164.
43. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC: **Genetic characterization of *vanG*. A novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:3224-3228.
44. National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS): **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** In *Twelve informational supplement M100-S12* Wayne, Pennsylvania; 2000.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



**Analysis of virulence determinants among the 51 *S. epidermidis* strains.**

Mother- infant Pair	Strain	Source <sup>a</sup>	<i>mecA</i>	SCC type	<i>fbe</i>	<i>atfE</i>	<i>icaD</i>	<i>embp</i>	CRA <sup>b</sup>	Oxacillin resistance	Hemolysin
1	LC002	M/BF	+	IV	-	+	+	+	+	+	-
1	LC011	M/BF	+	IV	-	+	-	+	-	+	-
1	LC015	M	-	-	+	+	-	+	-	-	-
1	LC016	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
1	LC017	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
1	LC019	M	-	-	+	+	-	+	-	-	-
1	LC044	M	+	IV	+	+	-	+	-	+	-
1	LC047	M	-	-	+	+	-	+	-	+	-
2	LE010	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
2	LE011	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
2	LE035	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3	LF001	M/BF	-	-	-	+	+	+	+	-	-
3	LF003	M	-	-	-	+	-	+	-	+	-
4	LG005	M/BF	-	-	+	+	-	+	-	-	+
4	LG006	M	+	IV	-	+	-	+	-	-	-
4	LG011	M/BF	-	-	-	+	-	+	-	+	-
4	LG5021	M	-	-	+	+	-	+	-	-	-
4	LG5022	M	-	-	+	+	-	+	-	-	-
4	LG5023	M/BF	-	-	+	+	+	+	-	-	-
5	LH522	M	-	-	-	+	-	+	-	+	-
5	LH524	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
6	LI55	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
7	LO102	M/BF	-	-	-	+	-	+	-	+	-
7	LO103	M/BF	-	-	-	+	-	+	-	-	-
7	LO502	M	-	-	-	+	+	+	-	-	-
7	HO122	BF	+	IV	+	+	-	+	-	-	-
8	LP222	M	+	IV	+	+	-	+	-	-	-
8	LP223	M/BF	+	IV	+	+	-	+	-	+	-
8	LP242	M/BF	-	-	-	+	-	+	-	-	-
8	LP245	M	+	IV	-	+	+	+	+	-	-
9	LM102	M/BF	-	-	-	+	-	+	-	-	-
9	LM141	M	-	-	-	+	-	+	-	+	-
9	LM152	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
10	LV104	M	-	-	-	+	+	+	+	-	-
10	LV221	M	+	IV	+	+	-	+	-	-	-
10	LV222	M	+	IV	-	+	-	+	-	+	-
10	LV521	M	+	IV	+	+	-	+	-	+	-
11	LX103	M/BF	-	-	-	+	-	+	+	-	-
11	LX123	M/BF	+	IV	-	+	+	+	+	+	-
11	LX121	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
11	LX154	M	+	IV	-	+	-	+	-	-	-
12	LZ153	M/BF	+	IV	-	+	-	+	-	+	-

**Analysis of virulence determinants among the 51 *S. epidermidis* strains (cont.)**

Mother- infant Pair	Strain	Source <sup>a</sup>	SCC						CRA <sup>b</sup>	Oxacillin resistance	Hemolysin
			<i>mecA</i>	type	<i>fbe</i>	<i>atlE</i>	<i>icaD</i>	<i>embp</i>			
12	LZ221	M/BF	-	-	-	+	-	+	-	-	-
12	HZ242	BF	-	-	-	+	+	+	-	+	-
13	LCC141	M/BF	+	IV	-	+	-	+	-	+	-
13	LCC254	M	-	-	-	-	-	+	-	+	-
13	LCC521	M	-	-	-	+	+	+	+	-	-
14	LGG152	M/BF	-	-	-	+	-	+	-	-	-
14	LGG252	M	-	-	-	+	-	+	-	-	-
15	LDD121	M/BF	-	-	-	+	+	+	+	-	-
16	LFF101	M/BF	-	-	-	+	-	+	-	-	-

<sup>a</sup>Source: isolated from milk (M), feces of breast-fed infants (BF) or both sources within the same mother-infant pair (M/BF); <sup>b</sup>CRA: Congo Red Agar Assay



**MIC distribution and percentage of resistance to different antibiotics among the *S. epidermidis* strains.**

	Number of isolates with MIC (µg/ml) of																				
Antibiotic	≤0.03	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	100	125	128	256	500	≤1000	S/R	% Resistance		
Penicillin	8	5		6	3	6	5	18										≤0.12/>4	35.29		
Ampicillin		13	6	4	6	7	2	6				7						≤0.12/>4	25.49		
Oxacillin			12	14	3	5	17 <sup>c</sup>											≤2/>2	33.33		
Ciprofloxacin			29	15	5	2												≤1/>1	3.91		
Fosfomycin									45	4	1		1					≤16/>16	11.76		
Nitrofurantoin										51								≤32/≥128	0		
Mupirocin							39								12			≤8/>256	0		
Streptomycin																	51	≤1000/>1000	0		
Gentamycin						45	4							1		1		≤1/>2	11.76		
Linezolid			3	3	16	20	8	1										≤4/≥4	1.96		
Tetracycline							32	19										≤4/>8	0		
Erythromycin			26	4	1	2	18											≤0.5/>4	0		
Clindamycin				40	3	8												≤0.5/>2	15.68		
Vancomycin				1	18	30	1	1										≤4/>8	0		
Teicoplanin				21	16	11	3											≤4/>8	0		
Q/D <sup>a</sup>			37	8	3		3											≤2/>2	5.88		
Chloranphenicol									40	11								≤8/>8	21.57		
Rifampin					49	2												-	-		
Imipenem		34	6	2	5	3	1											-	-		
	≤1/38	≥2/38																			
T/S <sup>b</sup>	37	14																		-	-
	≤0.5/0.25	1/0.5	2/1	4/2	>8/4																
Augmentine	33	10	4	2	1															≤0.5/0.25//>2/1	5.88

<sup>a</sup>Q/D: Quinupristin/Dalfopristin; <sup>b</sup>T/S: Trimethoprim/sulfamethoxazole; <sup>c</sup>17 isolates >2 µg/ml of Oxacillin.

# Analysis of virulence determinants among the enterococcal strains

Mother/infant pair	Strain	Source <sup>a</sup>	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>efaA<sub>fs</sub></i>	<i>ccf</i>	<i>cad</i>	<i>cob</i>	<i>cpd</i>	<i>eps</i>	<i>agg</i>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>	Hemolysis
<i>E. faecalis</i> :																	
1	HC046	BF	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	HE10	BF	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	MF002	M/BF	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
4	HG502	BF	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5	HI04	BF	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	MO22	BF	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	HP523	BF	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
9	HM501	BF	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	MV02	BF	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
11	MX01	BF	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	HX152	BF	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	MZ02	BF	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
12	HZ241	BF	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
13	MCC02	BF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
13	HCC523	BF	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
15	MDD01	BF	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
17	MA006	FF	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
18	MK01	FF	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
18	HK103	FF	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	MU23	FF	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
20	MW02	FF	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
20	HW121	FF	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
21	HBB141	FF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
21	HBB501	FF	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

### Analysis of virulence determinants among the enterococcal strains (cont.)

[illegible]

# **MIC distribution and percentage of resistance to different antibiotics among the enterococcal strains**

Antibiotic	Number of isolates with a MIC (µl/ml) of														S/R <sup>a</sup>	% Resistance
	≤0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>500	≤1000	>1000		
Penicillin				18	10	1									≤8/≥16	0
Ampicillin		1	23	4	1										≤8/≥16	0
Oxacillin					29 <sup>d</sup>										-	-
Ciprofloxacin		1	14	14											≤1/≥4	0
Fosfomycin							1	20	8						≤64/≥256	0
Nitrofurantoin								24	5						≤32/≥128	0
Mupirocin					4						25				-	-
Streptomycin													19	10	≤1000/>1000	34.48
Gentamycin					1	12				15		1			≤500/>500	3.44
Linezolid				22	6	1									≤2/≥8	3.44
Tetracycline					13	16									≤4/≥16	0
Erythromycin	3	4	5	6	11										≤0.5/≥8	0
Clindamycin		1	1	27												
Vancomycin		2	7	14	6										≤4/≥32	0
Teicoplanin		29													≤8/≥32	0
Q/D <sup>b</sup>		2		4	23										≤1/≥4	79.31
Chloramphenicol							24	5							≤8/≥32	0
Rifampin			14	15											≤1/≥4	0
Imipenem			4	19	5	1									-	-
T/S <sup>c</sup>	≤1/38 27	≥2/38 2													-	-
Augmentin	≤0.5/0.25 12	1/0.5 15	2/1 2	4/2	>8/4										-	-

<sup>a</sup> S/R: Susceptible/Resistant [44], <sup>b</sup> Q/D: Quinupristin/Dalfopristin, <sup>c</sup> T/S: Trimethoprim/sulfamethoxazole; <sup>d</sup> 29 isolates > 2 µg/ml of Oxacillin

**VII. AISLAMIENTO DE BIFIDO BACTERIAS DE LECH E MATERNA  
Y EVALUACIÓN DE LA POBLACIÓN DE BIFI DOBACTERIAS  
MEDIANTE qRTi-PCR Y PCR-DGGE**

**Artículo publicado en *Applied and Environmental Microbiology***



# Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR<sup>†</sup>

Rocío Martín,<sup>1</sup> Esther Jiménez,<sup>2</sup> Hans Heilig,<sup>1</sup> Leonides Fernández,<sup>2</sup> María L. Marín,<sup>2</sup>  
Erwin G. Zoetendal,<sup>1</sup> and Juan M. Rodríguez<sup>2\*</sup>

Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands,<sup>1</sup> and Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain<sup>2</sup>

Received 5 September 2008/Accepted 10 December 2008

**The objective of this work was to elucidate if breast milk contains bifidobacteria and whether they can be transmitted to the infant gut through breastfeeding. Twenty-three women and their respective infants provided samples of breast milk and feces, respectively, at days 4 to 7 after birth. Gram-positive and catalase-negative isolates from specific media with typical bifidobacterial shapes were identified to the genus level by F6PPK (fructose-6-phosphate phosphoketolase) assays and to the species level by 16S rRNA gene sequencing. Bifidobacterial communities in breast milk were assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), and their levels were estimated by quantitative real-time PCR (qRTi-PCR). Bifidobacteria were present in 8 milk samples and 21 fecal samples. *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis*, and *B. bifidum* were isolated from milk samples, while infant feces also contained *B. longum* and *B. pseudocatenulatum*. PCR-DGGE revealed the presence of one to four dominant bifidobacterial bands in 22 milk samples. Sequences with similarities above 98% were identified as *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum*, and *B. dentium*. Bifidobacterial DNA was detected by qRTi-PCR in the same 22 milk samples at a range between 40 and 10,000 16S rRNA gene copies per ml. In conclusion, human milk seems to be a source of living bifidobacteria for the infant gut.**

The bacterial colonization of the infant gut is a gradual process that exerts a strong influence on the health status of a host, since the members of the gut microbiota may contribute to the barrier effect against pathogens and/or to the maturation of the intestinal immune system (4). Traditionally, it has been considered that facultative anaerobic bacterial groups, such as streptococci, staphylococci, enterococci, lactobacilli, or enterobacteria, together with some strictly anaerobic ones, especially bifidobacteria, are among the first colonizers in breast-fed infants (6). In concert, they create the condition required for the proliferation of anaerobic bacteria, which become predominant after weaning (15). In contrast, the microbiota of formula-fed infants seems to be more diverse and prone to changes and contains higher counts of *Bacteroides*, *Clostridium*, and *Enterobacteriaceae* (2, 9, 10, 25, 31).

In recent years, culture-dependent and -independent analyses of the bacterial diversity of human milk have revealed that this biological fluid is a source of live staphylococci, streptococci, lactic acid bacteria, and enterobacteria for the infant gut (11, 17, 18, 20). Bifidobacterial DNA has also been detected in breast milk (8, 26), but to our knowledge, attempts to isolate bifidobacteria from this source have not been successful up to the present. Bifidobacteria are important members of the human gut microbiota and are believed to play a beneficial role in

maintaining the health of the host. They were first isolated a century ago from infant feces and were quickly associated with a healthy infant gut because of their predominance in breast-fed infants in comparison to formula-fed ones (34). Since then, it has been widely accepted that bifidobacteria represent one of the most important bacterial groups in the infant gut. In this location, they may contribute to the maturation of the gut barrier and the gut-associated lymphoid tissue. Some studies have suggested that infants with delayed bifidobacterial colonization and/or decreased bifidobacterial numbers may be more susceptible to a variety of gastrointestinal or allergic conditions (1, 16) and that, in these cases, the exogenous administration of selected bifidobacterial strains, alone or in combination with lactic acid bacteria, can reduce the incidence of such conditions (5, 13, 27, 33).

In this context, the objective of this study was the isolation and identification of bifidobacterial strains from breast milk and the analysis of the bifidobacterial community by molecular methods.

## MATERIALS AND METHODS

**Subjects and sampling.** A total of 23 women and their respective infants, which were fed by exclusive breastfeeding, participated in the study, and they were enrolled according to the following criteria: (i) healthy women without present or past underlying conditions; (ii) normal, full-term pregnancy; and (iii) absence of infant and/or maternal perinatal problems, including mastitis. None of the subjects enrolled in this study had received a probiotic treatment during pregnancy or after birth. All volunteers gave written informed consent to the protocol, which was approved by the Ethical Committee of Hospital Clínico (Madrid, Spain). The participants provided samples of breast milk, breast skin swabs, and infant feces between days 4 and 7 after birth. The milk samples were collected in a sterile tube by manual expression using sterile gloves. Previously,

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, Avda. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-91-3943837. Fax: 34-91-3943743. E-mail: jmrodrig@vet.ucm.es.

<sup>†</sup> Published ahead of print on 16 December 2008.

nipples and mammary areola had been cleaned with soap and sterile water and soaked in chlorhexidine (Cristalina; Salvat, Barcelona, Spain). The first drops (~500 µl) were discarded. Skin sampling was performed as described previously (24); briefly, a 4-cm<sup>2</sup> area of the upper outer quarter of each breast was gently rubbed using sterile cotton swabs soaked in ST solution (0.15 M NaCl with 0.1% Tween 20). The head of each swab was aseptically cut from the handle, placed into a microcentrifuge tube containing 100 µl of ST solution, centrifuged for 5 min, and then removed. Recently, it was shown that this procedure provides a representative profile of the microbial community of human skin (7). To detect possible contamination, negative controls were prepared using cotton swabs in ST solution without any contact with skin and then subjected to the above-mentioned procedures.

All the samples were kept at 4°C until delivery to the laboratory, which occurred within 1 h after collection.

**Isolation of bifidobacteria.** Proper peptone water dilutions of the milk, skin, and fecal samples were plated in triplicate onto Man-Rogosa-Sharp (MRS; Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) medium supplemented with L-cysteine (0.5 g/liter) (MRS-Cys) agar plates, which were incubated anaerobically (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (MINI-MACS; DW Scientific, Shipley, United Kingdom) at 37°C for 48 h. Between 50 and 75 isolates from each sample were randomly selected, grown in MRS-Cys broth, and stored at -80°C in the presence of glycerol (30%, vol/vol).

**Identification of the bacterial isolates.** The selected isolates were observed by optical microscopy to determine their morphology and Gram staining results. Additionally, they were tested for catalase, oxidase, nitrate reductase, gelatinase activities, production of indol, and production of gas from glucose. All the gram-positive and catalase-negative isolates with typical bifidobacterial shapes were identified to the genus level by demonstration of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) activity in cellular extracts (30) and to the species level by PCR sequencing of a 470-bp fragment of the 16S rRNA gene, using primers plb16 (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') and mlb16 (5'-GGCTGCTGGCAGCTAGTTAG-3') (positions 8 to 27 and 507 to 526 in the 16S rRNA gene sequence of *Escherichia coli*, respectively) (14). The PCR conditions were as follows: 96°C for 30 s, 48°C for 30 s, and 72°C for 45 s (40 cycles) and a final extension at 72°C for 4 min. The amplicons were purified using a Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Unit of the Universidad Complutense de Madrid, Spain. The resulting sequences were used to search sequences deposited in the EMBL database by using the BLAST algorithm, and the identities of the isolates were determined on the basis of the highest scores (>98%).

**PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and quantitative real-time PCR (qRTi-PCR) analyses of breast milk samples.** DNA was isolated from 23 samples of breast milk collected from healthy mothers by using a QIAamp DNA stool minikit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Cell lysis was further optimized by performing an additional step in which pellets were homogenized in 1.4 ml of ASL buffer (Qiagen) with the aid of 0.1 mm zirconium beads (Biospec, Bartlesville, OK), using a FastPrep instrument (QBioGene, Irvine, CA) for 30 s at 5,500 rpm.

*Bifidobacterium* genus-specific PCR was performed using 16S rRNA gene targeting primers. To prevent a low amplicon yield, we opted for the use of a nested PCR approach as described earlier (29). This involved a first PCR in which primers Im3 (5'-CGGGTGCTICCCACATTCATG-3') and Im26 (5'-GATTCTGGCTCAGGATGAACG-3') were used, followed by a second PCR with primers Bif164-F (5'-GGGTGTAATGCCGGATG-3') and Bif662-R (5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3'). For DGGE analysis of PCR products, a 40-bp GC clamp was attached to the 5' end of Bif662-R. Amplification of this fragment was successful in 22 out of 23 samples.

DGGE analysis of PCR amplicons was performed as described previously (22), using the DCode system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Polyacrylamide gels consisted of 8% (vol/vol) polyacrylamide (37.5:1 acrylamide-bisacrylamide) in 0.5× Tris-acetate-EDTA. A denaturing acrylamide of 100% was defined as 7 M urea and 40% formamide. The gels were poured from the top by using a gradient maker and a pump (Econopump; Bio-Rad, La Jolla, CA) set at a speed of 4.5 ml/min, and gradients of 45 to 55% were used for the separation of the generated amplicons. Immediately after the denaturing gel was poured (28-ml gradient volume), a 7.5-ml stacking gel without denaturing chemicals was added and the appropriate comb was inserted. Electrophoresis was performed for 16 h at 85 V with a 0.5× Tris-acetate-EDTA buffer at a constant temperature of 60°C. Gels were stained with AgNO<sub>3</sub> according to the method of Sanguinetti et al. (28).

PCR amplicons generated with primers Bif164-F and Bif662-R were used for constructing clone libraries, as described previously (16). Briefly, the PCR products were purified with a Nucleo Spin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions and were cloned in *E.*

*coli* XL-1 blue competent cells (Stratagene, La Jolla, CA) by using a pGEM-T easy cloning kit (Promega Corp., Madison, WI). Plasmids containing an insert of the appropriate size were screened by DGGE analysis. Representative clones corresponding to a specific banding position were selected for sequence analysis at the genomic facilities of BaseClear (Leiden, The Netherlands) and Parque Científico de Madrid (UCM, Madrid, Spain).

For qRTi-PCR assays, SYBR green PCR amplifications were performed with an iCycler iQ real-time detection system (Bio-Rad) associated with the iCycler Optical System Interface software program (version 2; Bio-Rad). The total bacterial copy number was determined with primers 1369F and 1492R (32) and, for bifidobacteria specifically, with primers Bif164F and Bif662R (26). All PCR experiments were carried out in triplicate with a reaction volume of 25 µl, using iCycler iQ 96-well optical-grade PCR plates (Bio-Rad) covered with iCycler optical-quality sealing film (Bio-Rad). The reaction mixture contained 2× SYBR green PCR mixture (Bio-Rad), 0.5 µM of each primer, and 5 µl of either the template or water. The amplification program consisted of 1 cycle at 95°C for 3 min and then 40 cycles at 95°C for 30 s, 62°C for 40 s, and 72°C for 1 min. The fluorescent product was detected at the last step of each cycle. Following amplification, melting temperature analysis of PCR products was performed to determine the specificity of the PCR. The melting curves were obtained by slow heating at 0.5°C/s increments from 62 to 95°C, with continuous fluorescence collection. For the determination of the number of bifidobacterial species present in each sample, fluorescent signals detected from two or three serial dilutions in the linear range of the assay were averaged and compared to a standard curve generated with standard DNA in the same experiment. Standard curves for all experiments were generated as follows. *Bifidobacterium longum* genomic DNA was subjected to PCR using the 27F and 1492R primers. The conditions were as follows: 95°C for 2 min; followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 52°C for 40 s, and 72°C for 90 s; and a final extension for 5 min at 72°C. The amplicons were purified using DNA Clean and Concentrator-5 (ZymoResearch, Orange, CA) according to the manufacturer's instructions, and the yield was quantified with a Nanodrop-1000 spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE). The 16S rRNA gene content, expressed as numbers of copies/ml, was calculated from the spectrophotometric results, using the average molecular weight of a nucleotide and standard solutions serially diluted from 10<sup>8</sup> to 10 and used in each quantitative PCR run. *B. longum* genomic DNA was selected to construct the standard curve because a previous study indicated that DNA from this species was dominant in breast milk samples (8).

**Nucleotide sequence accession numbers.** The sequences obtained in this study were deposited in the GenBank database under accession numbers FJ441215 to FJ441240.

## RESULTS

**Isolation and identification of bifidobacteria from breast milk samples and infant feces.** All the gram-positive and catalase-negative isolates with typical bifidobacterial shapes were identified to the genus level by the F6PPK test. In addition, none of these isolates produced either gas from glucose or indol, and all were negative for oxidase, nitrate reductase, and gelatinase activities. Globally, bifidobacteria were isolated from 8 milk samples and 21 fecal samples (Table 1), but in contrast, they could not be isolated from any breast skin swab. Isolates belonging to three bifidobacterial species were isolated from milk samples: *B. breve* (four milk samples), *B. adolescentis* (two samples), and *B. bifidum* (two samples) (Fig. 1). The species more frequently isolated from infant feces were *B. adolescentis* (11 samples), *B. bifidum* (6 samples), *B. longum* (5 samples), *B. breve* (4 samples), and *B. pseudocatenulatum* (4 samples) (Table 1 and Fig. 1).

**PCR-DGGE and qRTi-PCR analyses of breast milk samples.** DNA isolation and subsequent PCR-DGGE analysis of 16S rRNA genes were successful for 22 out of 23 samples (Fig. 2). The samples showed between one and four dominant bands. Sequence analysis of unique clones obtained from the samples containing the highest levels of diversity was used for further identification of the DGGE bands. Sequences with



TABLE 1. Bifidobacterial species isolated from the biological samples

Mother/child pair no.	Sample type	Bifidobacterial species
1	Milk	<i>B. adolescentis</i>
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i>
2	Milk	
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i>
3	Milk	
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i>
4	Milk	<i>B. adolescentis</i>
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i>
5	Milk	
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i>
6	Milk	
	Infant feces	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>
7	Milk	
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>B. dentium</i> , <i>B. angulatum</i>
8	Milk	
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i>
9	Milk	
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>
10	Milk	
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i>
11	Milk	<i>B. breve</i>
	Infant feces	<i>B. breve</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i>
12	Milk	
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i>
13	Milk	<i>B. breve</i>
	Infant feces	<i>B. breve</i>
14	Milk	
	Infant feces	<i>B. longum</i>
15	Milk	
	Infant feces	<i>B. dentium</i>
16	Milk	<i>B. breve</i>
	Infant feces	<i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i>
17	Milk	<i>B. bifidum</i>
	Infant feces	<i>B. bifidum</i>
18	Milk	<i>B. bifidum</i>
	Infant feces	<i>B. bifidum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i>
19	Milk	
	Infant feces	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i>
20	Milk	<i>B. breve</i>
	Infant feces	<i>B. breve</i>
21	Milk	
	Infant feces	<i>B. longum</i>
22	Milk	
	Infant feces	
23	Milk	
	Infant feces	

similarities above 98% were identified as *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum*, and *B. dentium* upon comparison with sequences of 16S rRNA genes of cultured bacterial isolates deposited in the NCBI database. Most breast

milk samples were dominated by *B. adolescentis*, which was present in 18 out of 22 samples. Sequences related to *B. longum*, *B. bifidum*, and *B. breve* were retrieved from 12, 8, and 4 samples, respectively. Clone j, related to *B. dentium*, was found in only one sample, as was clone g, *Bifidobacterium* spp., which did not reach the 98% threshold but had 97% similarity to *B. adolescentis* (Fig. 1 and 2). Bifidobacterial DNA was detected by qRTi-PCR in 22 out of 23 breast milk samples at a range between 40 and 10,000 16S rRNA gene copies per ml (Table 2). The percentages of bifidobacterial DNA among total bacterial DNA were  $\leq 16\%$  (Table 2).

## DISCUSSION

In recent years, breast milk has been shown to be a continuous source of commensal, mutualistic, and/or probiotic bacteria for the infant gut, including staphylococci, streptococci, and lactic acid bacteria (11, 20). These bacterial groups may also play an important role in the reduction of the incidence and severity of infections in the breast-fed infant. In fact, some of the lactic acid bacteria strains isolated from this biological fluid have the ability to inhibit the growth of a wide spectrum of pathogenic bacteria by competitive exclusion and/or through the production of antimicrobial compounds, such as bacteriocins, organic acids, or hydrogen peroxide (3, 21, 23).

Up to the present, the descriptions of bacterial diversity in breast milk have been based almost exclusively on the use of culture media that are suitable for the growth of lactic acid bacteria, streptococci, staphylococci, and closely related gram-positive bacteria (11, 20). This implies that the presence of additional bacterial species that are not cultivable or difficult to cultivate may have been overlooked. The recent application of culture-independent molecular techniques, particularly those based on 16S rRNA genes, has allowed a complementary assessment of the biodiversity of the human milk microbiota (8, 17) and has confirmed the strong influence of this biological fluid on the bacterial colonization of the neonatal gut (18). However, the number of molecular microbiology studies focused on human milk is still low, and their progressive incorporation will open new perspectives in this field.

The results of this work confirmed that the presence of bifidobacterial DNA is a common event in breast milk (8, 26). In addition, this is, to our knowledge, the first report describing the physical isolation of bifidobacteria from this biological fluid. Bifidobacteria were isolated from only 8 of the 23 milk samples. Among them, *B. breve* was isolated from the four samples in which DNA corresponding to this species was detected by PCR-DGGE and qRTi-PCR. Isolation of other bifidobacterial species whose DNA was present in the milk samples was more difficult (*B. adolescentis* and *B. bifidum*) or even impossible (*B. longum* and *B. pseudocatenulatum*). This may reflect the fastidious growth requirements of some bifidobacterial species that could be also present in the samples and/or their relatively low concentrations in this biological fluid. In this context, the fact that bifidobacteria were isolated from a higher number of infant feces samples (than from the corresponding breast milk ones) may be a consequence of their rather different concentrations ( $>10^7$  CFU/g in feces versus  $<10^3$  CFU/ml in breast milk).

The elucidation of the origin of the bacteria present in breast

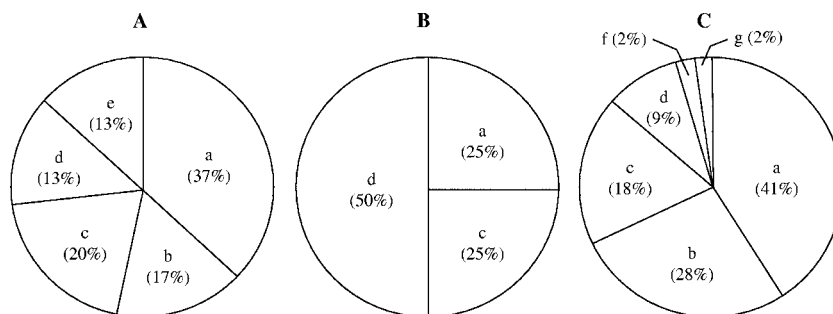


FIG. 1. Relative abundances (percentages) of the different bifidobacterial species isolated from infant feces (A) and breast milk samples (B) or detected in the clone library obtained from breast milk samples (C). a, *B. adolescentis*; b, *B. longum*; c, *B. bifidum*; d, *B. breve*; e, *B. pseudocatenulatum*; f, *B. dentium*; g, *Bifidobacterium* spp.

milk will be an attractive research target in the future. Traditionally, it was considered that they are acquired by skin contamination. Obviously, sampling of breast milk for microbiological analysis must take into account that skin contamination is almost unavoidable and that doubts as to the original location (internal mammary gland or skin) of the isolated bifidobacteria may arise; however, it has been pointed out that since bifidobacteria belongs to a strictly anaerobic genus, the latter source seems very unlikely (8). Such observation is in accordance with the results of this study since no bifidobacteria could be isolated from skin swabs obtained from women that provided the milk samples from which bifidobacteria were isolated. Although it has been shown that, under certain conditions, *Bifidobacterium boum* and *Bifidobacterium thermophilum* are able to grow in the presence of oxygen (12), these species were not detected in our study. In addition,

none of the bifidobacterial isolates obtained from milk samples or feces in this study grew in aerobic conditions. Previously, it was reported that lactobacilli and enterococcal isolates present in human milk are genotypically different from those isolated in the skin, within the same bacterial species and the same host (20). The suggestions that the origin of the live bacteria found in breast milk could be the maternal gut and that the bacteria arrive at the mammary gland through an endogenous route (the so-called entero-mammary pathway) involving maternal dendritic cells and macrophages (19) has recently been confirmed (26). These authors showed that fresh human milk contains a number ( $<3 \log$  CFU/ml) of viable bacteria and a wide range of free bacterial DNA signatures, including bifidobacterial DNA, which may program the neonatal immune system.

In conclusion, the results of this study indicate that breast

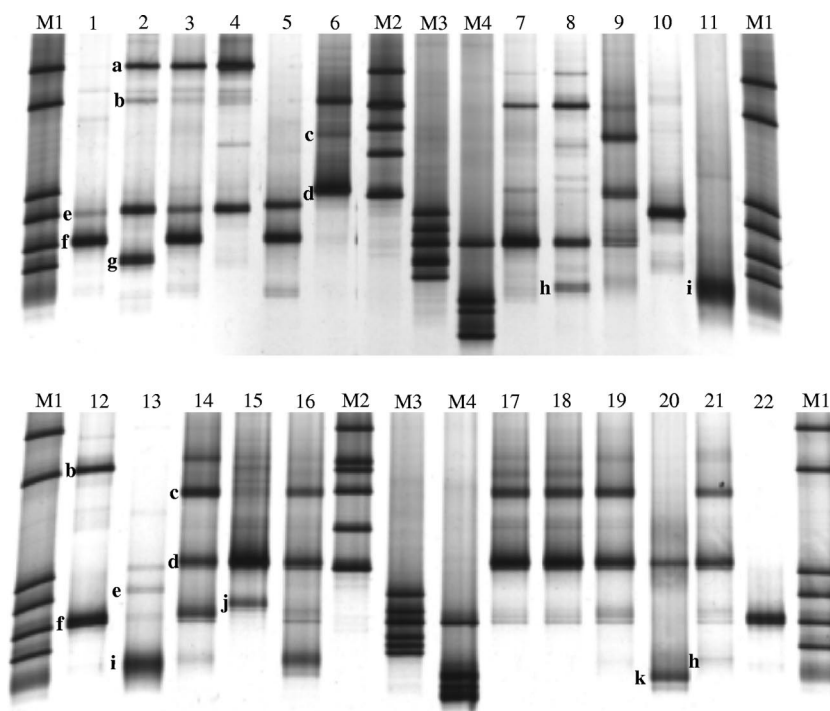


FIG. 2. *Bifidobacterium* species diversity in breast milk samples (lanes 1 to 22) as determined by DGGE. Dominant bands were identified as corresponding to *B. adolescentis* (a), *B. adolescentis* (b), *B. bifidum* (c), *B. longum* (d), *B. adolescentis* (e), *B. adolescentis* (f), *Bifidobacterium* spp. (97% *B. adolescentis*) (g), *B. longum* (h), *B. breve* (i), *B. dentium* (j), and *B. breve* (k). M1 to M4 are markers.

TABLE 2. Counts of bacteria and bifidobacteria in breast milk samples as determined by qRTi-PCR

Mother/child pair no.	Total no. of bacteria <sup>a</sup>	No. of bifidobacteria <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>
1	1.14E + 05	4.04E + 03	3.54
2	4.04E + 05	1.16E + 04	2.87
3	2.08E + 05	1.08E + 04	5.19
4	1.48E + 05	9.40E + 03	6.35
5	1.43E + 05	5.20E + 03	3.64
6	1.17E + 05	1.04E + 02	0.09
7	9.00E + 07	8.68E + 02	0.00
8	2.48E + 05	6.88E + 03	2.77
9	2.40E + 02	0.00E + 00	0.00
10	1.08E + 05	3.15E + 03	2.92
11	4.56E + 04	7.32E + 03	16.05
12	7.72E + 04	2.01E + 03	2.60
13	6.68E + 04	5.04E + 03	7.54
14	1.25E + 05	2.13E + 02	0.17
15	1.36E + 05	4.32E + 01	0.03
16	1.61E + 05	1.00E + 03	0.62
17	8.40E + 06	9.36E + 02	0.01
18	1.16E + 05	6.00E + 02	0.52
19	1.27E + 05	1.74E + 03	1.37
20	2.25E + 05	1.72E + 02	0.08
21	1.20E + 05	1.50E + 02	0.13
22	4.44E + 04	2.42E + 03	5.45
Mean	4.60E + 06	3.35E + 03	2.82

<sup>a</sup> Expressed as the number of copies of the 16S rRNA gene.<sup>b</sup> Bifidobacterial load expressed as the percentage of total bacteria.

milk is a source of bifidobacteria for the infant gut. Work is in progress to characterize some of the bifidobacterial strains isolated in this study and to further investigate the role of milk bifidobacteria in the development of the infant gut microbiota.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was partly supported by the FUN-C-FOOD (Consolider-Ingenio 2010) and AGL2007-62042 projects of the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

#### REFERENCES

- Arvola, T., T. Ruuska, J. Keränen, H. Hyöty, S. Salminen, and E. Isolauri. 2006. Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. *Pediatrics* **117**:e760–e768.
- Balmer, S. E., and B. A. Wharton. 1989. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch. Dis. Child.* **64**:1672–1677.
- Beasley, S. S., and P. E. J. Saris. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5051–5053.
- Cebra, J. J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**:1046S–1051S.
- Correa, N. B., L. A. Peret Filho, F. J. Penna, F. M. Lima, and J. R. Nicoli. 2005. A randomised formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**:385–389.
- Favier, C. F., W. M. De Vos, and A. D. Akkermans. 2003. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* **9**:219–229.
- Grice, E. A., H. H. Kong, G. Renaud, A. C. Young, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, T. G. Wolfsberg, M. L. Turner, J. A. Segre, et al. 2008. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* **18**:1043–1050.
- Gueimonde, M., K. Laitinen, S. Salminen, and E. Isolauri. 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* **92**:64–66.
- Haarman, M., and J. Knol. 2005. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2318–2324.
- Harmsen, H. J., A. C. Wildeboer-Veloo, A. A. Raangs, N. Wagendorp, J. G. Klijn, J. G. Bindels, and G. W. Wellings. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**:61–67.
- Heikkilä, M. P., and P. E. J. Saris. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* **95**:471–478.
- Kawasaki, S., T. Mimura, T. Satoh, K. Takeda, and Y. Niimura. 2006. Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:6854–6858.
- Kirjavainen, P. V., T. Arvola, S. Salminen, and E. Isolauri. 2002. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target for bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* **51**:51–55.
- Kullen, M. J., R. B. Sanozky-Dawes, D. C. Crowell, and T. R. Klaenhammer. 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* **89**:511–516.
- Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**:1035S–1045S.
- Mah, K. W., B. Björkstén, B. W. Lee, H. P. van Bever, L. P. Shek, T. N. Tan, Y. K. Lee, and K. Y. Chua. 2006. Distinct pattern of commensal gut microbiota in toddlers with eczema. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **140**:157–163.
- Martín, R., H. G. Heilig, E. G. Zoetendal, E. Jiménez, L. Fernández, H. Smidt, and J. M. Rodríguez. 2007. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res. Microbiol.* **158**:31–37.
- Martín, R., H. G. Heilig, E. G. Zoetendal, H. Smidt, and J. M. Rodríguez. 2007. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J. Appl. Microbiol.* **103**:2638–2644.
- Martín, R., S. Langa, C. Reviriego, E. Jiménez, M. L. Marín, M. Olivares, J. Boza, J. Jiménez, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **15**:121–127.
- Martín, R., S. Langa, C. Reviriego, E. Jiménez, M. L. Marín, J. Xaus, L. Fernández, and J. M. Rodríguez. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* **143**:754–758.
- Martín, R., M. Olivares, M. L. Marín, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez. 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* **21**:8–17.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, and G. A. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695–700.
- Olivares, M., M. P. Díaz-Ropero, R. Martín, J. M. Rodríguez, and J. Xaus. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol.* **101**:72–79.
- Paulino, L. C., C. H. Tseng, B. E. Strober, and M. J. Blaser. 2006. Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2933–2941.
- Penders, J., C. Vink, C. Driessen, N. London, C. Thijs, and E. E. Stobberingh. 2005. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**:141–147.
- Perez, P. F., J. Doré, M. Leclerc, F. Levenez, J. Benyacoub, P. Serrant, I. Segura-Roggero, E. J. Schiffrin, and A. Donnet-Hughes. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* **119**:e724–e732.
- Saavedra, J. M., N. A. Bauman, I. Oung, J. A. Perman, and R. H. Yolken. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* **344**:1046–1049.
- Sanguinetti, C. J., E. Dias Nieto, and A. J. G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* **17**:914–921.
- Satokari, R. M., E. E. Vaughan, A. D. L. Akkermans, M. Saarela, and W. M. de Vos. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:504–513.
- Scardovi, V. 1986. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472<sup>AL</sup>, p. 1418–1434. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Stark, P. L., and A. Lee. 1982. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.* **15**:189–203.
- Suzuki, M. T., O. Beja, L. T. Taylor, and E. F. Delong. 2001. Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. *Environ. Microbiol.* **3**:323–331.
- Thibault, H., C. Aubert-Jacquin, and O. Goulet. 2004. Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **39**:147–152.
- Tissier, H. 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *C. R. Soc. Biol.* **60**:359–361.

**VIII. ADMINISTRACIÓN ORAL DE CEPAS DE LACTOBACILOS  
AISLADAS DE LECHE MATERNA COMO TRATAMIENTO  
ALTERNATIVO DE MASTITIS INFECCIOSAS  
LACTACIONALES**

**Artículo publicado en *Applied and Environmental Microbiology***



## Oral Administration of *Lactobacillus* Strains Isolated from Breast Milk as an Alternative for the Treatment of Infectious Mastitis during Lactation<sup>▽</sup>

E. Jiménez,<sup>1</sup> L. Fernández,<sup>1</sup> A. Maldonado,<sup>1</sup> R. Martín,<sup>1</sup> M. Olivares,<sup>2</sup> J. Xaus,<sup>2</sup> and J. M. Rodríguez<sup>1\*</sup>

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain,<sup>1</sup> and Department of Biomedicine, Puleva Biotech, 18004 Granada, Spain<sup>2</sup>

Received 16 November 2007/Accepted 17 January 2008

**In this study, 20 women with staphylococcal mastitis were randomly divided in two groups. Those in the probiotic group daily ingested 10 log<sub>10</sub> CFU of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 and the same quantity of *Lactobacillus gasseri* CECT5714 for 4 weeks, while those in the control one only ingested the excipient. Both lactobacillus strains were originally isolated from breast milk. On day 0, the mean staphylococcal counts in the probiotic and control groups were similar (4.74 and 4.81 log<sub>10</sub> CFU/ml, respectively), but lactobacilli could not be detected. On day 30, the mean staphylococcal count in the probiotic group (2.96 log<sub>10</sub> CFU/ml) was lower than that of the control group (4.79 log<sub>10</sub> CFU/ml). *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714 were isolated from the milk samples of 6 of the 10 women of the probiotic group. At day 14, no clinical signs of mastitis were observed in the women assigned to the probiotic group, but mastitis persisted throughout the study period in the control group women. In conclusion, *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714 appear to be an efficient alternative for the treatment of lactational infectious mastitis during lactation.**

Mastitis, an inflammation of one or more lobules of the mammary gland, is a common disease during lactation since its incidence oscillates between 3 and 33% of lactating mothers (5, 28). Although the disease may happen at any point during the lactation period, between 75 and 95% of cases occur within the first 12 weeks, and the frequency is particularly higher during the second and third weeks postpartum (21).

Lactational mastitis usually has an infectious origin (9). Traditionally, *Staphylococcus aureus* has been considered the main etiological agent, although *Staphylococcus epidermidis* is emerging as the leading cause in both human and veterinary medicine (3, 25, 29). Multidrug resistance to antibiotics and/or formation of biofilms is very common among clinical isolates of these two staphylococcal species; therefore, it is not strange that ca. 70 to 90% of the cases of staphylococcal mastitis in bovines (where this condition has been exhaustively studied) are refractory to antibiotherapy (27).

Breast milk is an important source of bacteria to the infant gut, where they play a key role in the initiation and development of the gut microbiota. Bacteria commonly isolated from this biological fluid include staphylococci, streptococci, lactococci, lactobacilli, and enterococci (6, 12). In previous studies, we isolated lactobacillus strains belonging to the species *Lactobacillus gasseri*, *L. fermentum*, and *L. salivarius* from milk of healthy mothers (10, 12) and showed that their probiotic potential is similar to that of the strains commonly used in commercial probiotic products (10, 14). It has also been suggested that commensal bacteria isolated from human milk have po-

tential use as bacteriotherapeutic agents for the prevention of breast infections caused by *S. aureus* (6).

Parallel studies suggested that lactobacilli and other lactic acid bacteria present in human milk may have an endogenous origin (12) and, upon interactions with dendritic cells in the maternal gut, these bacteria would reach the mammary gland along the enteromammary pathway (13), a hypothesis that has been confirmed recently (19). In this context, the aim of the present study was to evaluate whether oral administration of two *Lactobacillus* strains isolated from breast milk, *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714, may be an alternative or a complement for treating staphylococcal lactational mastitis in cases in which previous antibiotherapy was unsuccessful. In addition, a second objective was to investigate whether the oral administration of lactobacilli may actually lead to their presence in breast milk.

### MATERIALS AND METHODS

**Design of the study and collection of the milk samples.** A total of 20 women age 26 to 34 years with clinical symptoms of staphylococcal mastitis participated in the study. All of them met the following criteria: breast redness and pain, flu-like symptoms (including fever  $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ ), a milk staphylococcal count higher than 4 log<sub>10</sub> CFU/ml, and a milk leukocyte count higher than 6 log<sub>10</sub> CFU/ml. Most of them ( $n = 14$ ) presented with fissures in the mammary areola and/or nipple. All of them had received antibiotherapy (cloxacillin, clindamycin, amoxicillin-clavulanic acid, and/or erythromycin) for 2 to 4 weeks, but the respective treatments (which finished at least 2 weeks before the present study) had failed to improve their condition. None of them ingested commercial probiotic foods or supplements during the study. Women with mammary abscesses or any kind of parallel diseases were excluded. All volunteers gave written informed consent to the protocol, which was approved by the Ethical Committee of Hospital Clínico de Madrid (Spain). The volunteers were randomized into two groups (probiotic and control) by sealed envelope, and neither volunteers nor investigators knew the code during the investigation.

The study lasted 30 days and, during this period, the probiotic group ( $n = 10$ ) daily consumed a capsule with 200 mg of a freeze-dried probiotic containing  $\sim 10$  log<sub>10</sub> CFU each of *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714 in a matrix of methylcellulose. Both strains were originally isolated from the breast milk of

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-91-3943837. Fax: 34-91-3943743. E-mail: jmrodrig@vet.ucm.es.

<sup>▽</sup> Published ahead of print on 6 June 2008.



healthy women (10, 12). The entire process to obtain the probiotic strains and to prepare the capsules was performed in the industrial probiotic plant of Puleva Biotech S.A. (Granada, Spain). The capsules were kept at 4°C throughout the study. The viability of both strains was measured weekly by triplicate to guarantee that it was >99.99999% throughout the study. For this purpose, appropriate dilutions of the capsule content were spread onto plates of MRS agar (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom), and identification of the colonies was carried out by species-specific PCR as described below. The placebo group daily received a capsule containing 200 mg of the same methylcellulose batch. Breast milk samples were obtained from the volunteers at the beginning of the study (before the ingestion of the first capsule [day 0]) and at the end of the trial period (day 30). One of the volunteers of the control group only provided milk samples from the right breast because the left one was not functional as a result of a previous carcinoma. To collect the breast milk samples, nipple and mammary areola were cleaned with soap and sterile water, and then chlorhexidine was applied. The breast milk sample was collected in a sterile tube after manual expression by using sterile gloves. The first drops (approximately 250 µl) were discarded to avoid chlorhexidine contamination. The evolution of the symptoms was evaluated weekly by midwives of the day care centers to which the volunteers were ascribed.

**Count and identification of bacteria in the milk samples.** Proper dilutions of the fresh breast milk samples were spread onto Baird-Parker (BP) agar plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for selective isolation and quantification of staphylococci and, in parallel, onto agar plates of MRS agar supplemented with L-cysteine (0.5 g/liter) (MRS-Cys) for the isolation of lactobacilli. All of the plates were incubated for 48 h at 37°C, the BP plates in aerobic conditions and those of MRS-Cys anaerobically (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in a MACS-MG-1000-anaerobic workstation (DW Scientific, Shipley, United Kingdom). Although staphylococci can grow in MRS-Cys, they are easily differentiated from lactobacilli (gram-positive, catalase-negative rods and gram-positive, catalase-positive cocci, respectively). Lactobacilli do not grow in BP medium. As a consequence, all of the colony types growing on BP and MRS-Cys plates were subjected to microscope observation (shape, Gram staining) and assayed for catalase activity.

Staphylococci (10 colonies from each milk sample) were identified at the species level by classical morphological and biochemical tests and by a novel multiplex PCR method based on the *dnaJ* genes. Briefly, a single colony growing on solid medium was resuspended in 100 µl of sterile deionized water. Then, 100 µl of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was added to the suspension, which was stirred for 5 s and centrifuged at 16,000 × g for 5 min at 4°C. Subsequently, 5 to 10 µl of the upper aqueous phase was used as a source of DNA template for PCR with the primers J-StGen (5'-TGGCCAAAAGAGACTATTATGA-3'), J-StAur (5'-GGATCTCTTTGTCTGCCG-3'), and J-StEpi (5'-CCACCAAAGCCTTGA CTT-3') in an Icyler thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The primer pairs J-StGen/J-StAur and J-StGen/J-StEpi result in a 337-bp *S. aureus* species-specific fragment and a 249-bp *S. epidermidis* species-specific fragment, respectively. The PCR conditions were as follows: 1 cycle of 94°C for 4 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s, with a final extension of 72°C for 5 min. The identification of the staphylococcal isolates either as *Staphylococcus epidermidis* or *S. aureus* was confirmed by 16S rRNA sequencing by using the primers pbl16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and mbl16 (5'-GGCTGTGGCAGCTAGTTAG-3') (8). The PCR conditions were as follows: 96°C for 30 s, 48°C for 30 s, and 72°C for 45 s (40 cycles) and a final extension at 72°C for 4 min. The amplicons were purified by using a Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Unit of the Universidad Complutense de Madrid (Spain). The resulting sequences were used to search sequences deposited in the EMBL database using BLAST algorithm, and the identities of the isolates were determined on the basis of the highest scores (≥99%).

Microbiological data, recorded as CFU/ml of milk, were transformed to logarithmic values before statistical analysis. The reported values of bacterial counts are the mean values of duplicate or triplicate determinations ± the standard deviations (SD). The Kruskal-Wallis test was applied to determine whether the obtained mean values of log staphylococcal counts within each experimental group were identically distributed before starting the treatment. The Mann-Whitney (Wilcoxon) test was used to evaluate the differences between the probiotic and the control group. The significance level was established at  $P < 0.01$ . All analyses were performed by using the Statgraphics Plus 5.0 software (Manugistics, Inc., Rockville, MD).

**Detection of *L. salivarius* and *L. gasseri* in the milk samples by colony hybridization, species-specific PCR, and 16S rRNA sequencing.** A DNA-DNA colony hybridization assay was developed to investigate whether the oral administration of the lactobacillus strains led to their presence in breast milk at day 30. For this

purpose, two species-specific probes (for the detection of *L. salivarius* and *L. gasseri*, respectively) were designed on the basis of unique 16S rRNA sequences. In the case of *L. salivarius*, a fragment (210 bp) was amplified from *L. salivarius* CECT5713 genomic DNA using the primers SAL91F (5'-ATTCACCGTAAGA AGT-3') and SAL285R (5'-TATCATCACCTTGGTAG-3'). Genomic DNA was isolated from 10 ml overnight MRS cultures by using the DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the protocol recommended by the supplier for isolation of genomic DNA from gram-positive bacteria. Separately, a fragment (200 bp) was amplified from *L. gasseri* CECT5714 genomic DNA using the primers Gas I (5'-GAGTGGGAGAGCACTAAAG-3') and Gas II (5'-TATCATCACCTTGGTAG-3'). The PCR conditions were as follows: 95°C for 2 min (1 cycle); 95°C for 30 s, 46°C (*L. salivarius*) or 55°C (*L. gasseri*) for 30 s, and 72°C for 45 s (40 cycles); and a final extension at 72°C for 4 min. Both PCR fragments were purified by using the QIAquick spin PCR purification kit (Qiagen) and labeled by using the Amersham ECL direct nucleic acid labeling and detection system (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom).

For colony hybridization, colonies (100 per mother) obtained on MRS-Cys plates from breast milk samples (day 30) were grown in MRS broth at 37°C overnight. These cultures were then spotted in a regular array on two sets of MRS-Cys replica plates. Once the colonies had grown, nylon Hybond-N<sup>+</sup> discs (GE Healthcare) were laid directly on the culture surfaces and kept for at least 1 min. Then, both hybridization and detection were carried out according to the instructions of the Amersham ECL direct nucleic acid labeling and detection system with the modifications previously described (15) and a probe concentration of approximately 10 ng/ml. The identity of the isolates that gave a positive signal after colony hybridization was confirmed by 16S rRNA sequencing using the primers pbl16 and mbl16 as described above.

In parallel, identification of the isolates was also assessed by species-specific PCR using the primers lowlac (5'-CGACGACCATGAACCACCTGT-3') and sal1 (5'-ATTCACCTCGTAAGAAGT-3') for *L. salivarius*, which results in a 993-bp fragment (2), and the primers Lgas-1 (5'-AGCGACGAGAAGAGAG AGA-3') and Lgas-2 (5'-TGCTATCGCTTCAAGTGCTT-3') for *L. gasseri*, which generates a 360-bp fragment (23).

**Identification of *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714 in the milk samples by PFGE.** Later, and to check whether *L. salivarius* and *L. gasseri* isolates actually belonged to the strains CECT5713 and CECT5714, respectively, the samples were subjected to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) genotyping. Chromosomal DNA was extracted from the isolates and digested with the endonuclease SmaI (New England Biolabs, Ipswich, MA) at 25°C for 24 h. Electrophoresis was carried out in a CHEF DR II apparatus (Bio-Rad, Birmingham, United Kingdom) in 1% (wt/vol) SeaKem GTG agarose (FMC, Philadelphia, PA) with 0.5× TBE buffer (45 mM Tris-HCl, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA [pH 8.0]) at 15°C. A constant voltage of 200 V was applied to the system, and fragment separation was performed by using a two-phase program. The electrophoretic conditions for separating the SmaI fragments were a pulse from 0.5 to 5 s for 10 h and then another from 0.5 to 10 s for 6 h. LowRange PFG marker and MidRange PFG marker I (New England Biolabs) were used as molecular size standards. Agarose gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), and images were digitized with a GelPrinter Plus System (TDI, Madrid, Spain).

## RESULTS

Counts of staphylococci and lactobacilli in the milk samples. At day 0, the total staphylococcal counts in the breast milk of all of the women ranged from 4.04 to 5.54 log<sub>10</sub> CFU/ml (Fig. 1). Mean staphylococcal counts in the probiotic and control groups (Table 1) were similar (4.74 and 4.81 log<sub>10</sub> CFU/ml, respectively). The Kruskal-Wallis test confirmed that the mean values of log staphylococcal counts were identically distributed in both groups before the trial ( $P = 0.806$ ). On the other hand, lactobacilli could not be detected at that sampling time in any of these samples. By using species-specific PCR and 16S rRNA sequencing, the staphylococci isolated from milk of subjects 1, 2, 5, 8, 12, 14, 19, and 20 were identified as *S. aureus*, while those present in the rest of the women were identified as *S. epidermidis*. The partial 16S rRNA gene sequences obtained from the *S. aureus* and the *S. epidermidis* isolates were deposited in the EMBL nucleotide sequence database under acces-

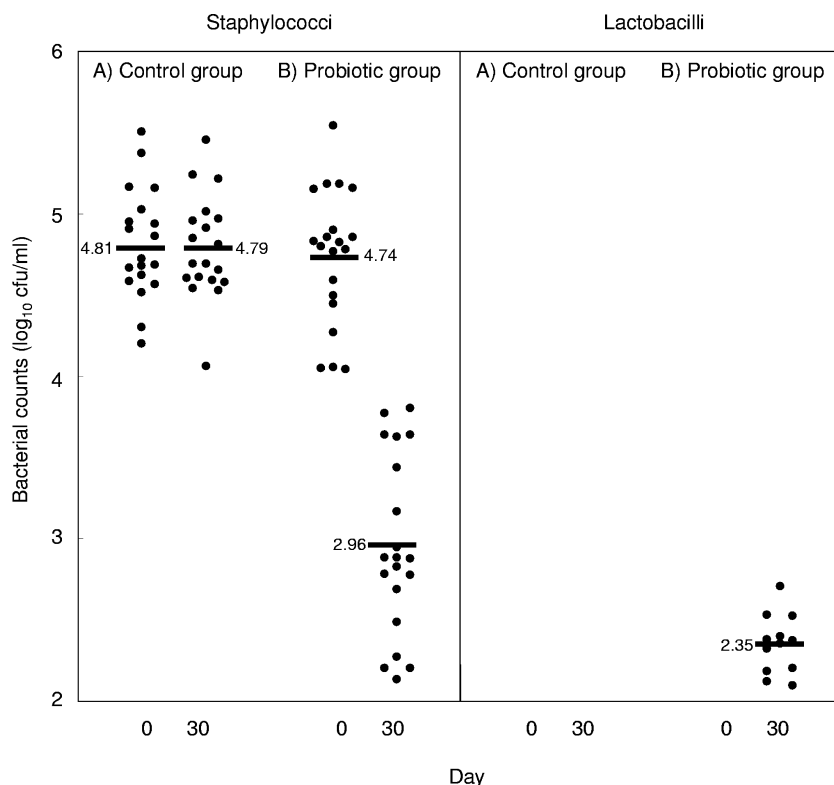


FIG. 1. Staphylococcal counts in the milk samples obtained from women of the control (A) and probiotic (B) groups at days 0 and 30. The black bars (and the associated number) indicate the mean of the values.

sion numbers EU280807 and EU280808, respectively. No other staphylococcal species were detected.

On day 30, the mean staphylococcal count in the probiotic group ( $2.96 \log_{10}$  CFU/ml) was statistically lower than that corresponding to the control group ( $4.79 \log_{10}$  CFU/ml). Reductions of approximately 1.5 to 2.0 log cycles in the staphylococcal count were observed among the milk samples of the probiotic group. In contrast, the concentration of staphylococci in the control group remained stable during the trial period (Fig. 1). Again, all of the staphylococcal isolates were identified as *S. aureus* (subjects 1, 2, 5, 8, 12, 14, 19, and 20) or *S. epidermidis* (the rest of the women). A Mann-Whitney test revealed that there were statistically significant differences between the probiotic and the control group concerning the staphylococcal values (Wilcoxon,  $P = 0.002$ ). In relation to the lactobacilli, isolates belonging to this genus could not be detected in any of the control group samples, but they were isolated (2.09 to  $2.70 \log_{10}$  CFU/ml) in the samples obtained from 6 of the 10 women in the probiotic group (Table 1).

**Evolution of the clinical symptoms.** Clinical symptoms were evaluated weekly by a midwife. At day 7, symptoms had notably improved among women of the probiotic group since local inflammation and flu-like signs had disappeared. At day 14, no clinical signs of mastitis were observed in the women assigned to this group and, in the case of those that initially displayed fissures in the nipple and/or mammary areola (subjects 1, 3, 4, 5, 6, and 9), the fissures were completely healed (Fig. 2). In contrast, clinical signs persisted in control group women throughout the study period.

#### Detection of *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714 in the milk samples.

A total of 100 isolates (per mother) obtained on MRS-Cys plates from day 30 milk samples were spotted in a regular array onto two sets of MRS-Cys replica plates. One of the sets was submitted to colony hybridization using a *L. gasseri*-specific probe and, subsequently, an *L. salivarius*-specific probe. Both *L. salivarius* and *L. gasseri* isolates were detected in the milk samples of six of the women belonging to the probiotic group (Fig. 3). In the six cases, ca. 70% of the lactobacilli hybridized with the *L. salivarius* probe, while the remaining 30% hybridized with that of *L. gasseri*. The isolates that did not react with any of the probes were later identified as staphylococci, which is not strange since this bacterial group can grow on MRS-Cys plates. All of the potential lactobacillus isolates hybridized with any of these probes, which suggested that only these two species were present in the samples. These results were confirmed by *L. salivarius* and *L. gasseri* species-specific PCR using primers different from those used to generate the respective probes and by nucleotide sequencing of PCR fragments corresponding to the 16S rRNA gene. The sequences obtained from one of the *L. gasseri* and one of the *L. salivarius* isolates have been deposited in the GenBank database under accession numbers EU035754 and AM087452, respectively.

Finally, the lactobacillus isolates were genetically typified by the PFGE technique. The profiles revealed that all *L. salivarius* and *L. gasseri* isolates actually belonged to the strains CECT5713 and CECT5714, respectively (Fig. 4).



TABLE 1. Staphylococcus and lactobacillus counts in the breast milk samples

Group	Subject	Breast <sup>a</sup>	Count (log <sub>10</sub> CFU/ml $\pm$ SD) <sup>d</sup>			
			Staphylococci		Lactobacilli	
			Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
Probiotic group <sup>b</sup>	1	R	4.86 $\pm$ 0.01	2.77 $\pm$ 0.10	ND	2.53 $\pm$ 0.05
		L	4.82 $\pm$ 0.02	2.20 $\pm$ 0.01	ND	2.53 $\pm$ 0.02
	2	R	5.54 $\pm$ 0.04	3.77 $\pm$ 0.06	ND	ND
		L	4.05 $\pm$ 0.08	2.68 $\pm$ 0.01	ND	ND
	3	R	5.18 $\pm$ 0.09	3.64 $\pm$ 0.01	ND	ND
		L	5.18 $\pm$ 0.13	3.64 $\pm$ 0.03	ND	ND
	4	R	4.77 $\pm$ 0.03	2.88 $\pm$ 0.03	ND	2.12 $\pm$ 0.11
		L	4.50 $\pm$ 0.02	2.88 $\pm$ 0.03	ND	2.18 $\pm$ 0.12
	5	R	4.04 $\pm$ 0.07	2.20 $\pm$ 0.03	ND	2.37 $\pm$ 0.07
		L	4.44 $\pm$ 0.06	2.82 $\pm$ 0.02	ND	2.38 $\pm$ 0.03
	6	R	4.83 $\pm$ 0.04	3.44 $\pm$ 0.04	ND	ND
		L	4.80 $\pm$ 0.01	2.49 $\pm$ 0.10	ND	ND
	7	R	4.06 $\pm$ 0.09	2.27 $\pm$ 0.12	ND	2.32 $\pm$ 0.09
		L	5.15 $\pm$ 0.09	3.17 $\pm$ 0.09	ND	2.09 $\pm$ 0.10
	8	R	5.16 $\pm$ 0.12	3.62 $\pm$ 0.04	ND	ND
		L	4.90 $\pm$ 0.08	3.80 $\pm$ 0.11	ND	ND
	9	R	4.59 $\pm$ 0.06	2.94 $\pm$ 0.05	ND	2.35 $\pm$ 0.06
		L	4.78 $\pm$ 0.02	2.78 $\pm$ 0.04	ND	2.70 $\pm$ 0.05
	10	R	4.85 $\pm$ 0.02	2.13 $\pm$ 0.08	ND	2.40 $\pm$ 0.03
		L	4.27 $\pm$ 0.08	2.88 $\pm$ 0.05	ND	2.20 $\pm$ 0.20
Control group <sup>c</sup>	11	R	4.95 $\pm$ 0.02	4.60 $\pm$ 0.04	ND	ND
		L	NA	NA	NA	NA
	12	R	5.16 $\pm$ 0.02	5.21 $\pm$ 0.03	ND	ND
		L	5.16 $\pm$ 0.06	5.24 $\pm$ 0.09	ND	ND
	13	R	4.51 $\pm$ 0.08	4.54 $\pm$ 0.07	ND	ND
		L	4.57 $\pm$ 0.06	4.61 $\pm$ 0.03	ND	ND
	14	R	4.66 $\pm$ 0.05	4.65 $\pm$ 0.09	ND	ND
		L	4.68 $\pm$ 0.04	4.69 $\pm$ 0.04	ND	ND
	15	R	4.90 $\pm$ 0.02	4.91 $\pm$ 0.01	ND	ND
		L	4.68 $\pm$ 0.02	4.69 $\pm$ 0.02	ND	ND
	16	R	5.50 $\pm$ 0.09	5.45 $\pm$ 0.03	ND	ND
		L	5.03 $\pm$ 0.05	4.97 $\pm$ 0.08	ND	ND
	17	R	5.37 $\pm$ 0.01	4.84 $\pm$ 0.03	ND	ND
		L	4.58 $\pm$ 0.04	4.58 $\pm$ 0.07	ND	ND
	18	R	4.72 $\pm$ 0.06	4.96 $\pm$ 0.02	ND	ND
		L	4.86 $\pm$ 0.02	4.81 $\pm$ 0.02	ND	ND
	19	R	4.62 $\pm$ 0.12	4.59 $\pm$ 0.04	ND	ND
		L	4.94 $\pm$ 0.02	5.01 $\pm$ 0.05	ND	ND
	20	R	4.20 $\pm$ 0.05	4.06 $\pm$ 0.04	ND	ND
		L	4.30 $\pm$ 0.04	4.53 $\pm$ 0.04	ND	ND

<sup>a</sup> The milk sample was obtained from the right (R) or left (L) breast.

<sup>b</sup> Mean values (log<sub>10</sub> CFU/ml  $\pm$  SD): 4.74  $\pm$  0.41 (staphylococci at day 0), 2.96  $\pm$  0.55 (staphylococci at day 30), and 2.35  $\pm$  0.18 (lactobacilli at day 0).

<sup>c</sup> Mean values (log<sub>10</sub> CFU/ml  $\pm$  SD): 4.81  $\pm$  0.22 (staphylococci at day 0) and 4.79  $\pm$  0.23 (staphylococci at day 30).

<sup>d</sup> ND, not determined; NA, sample not available.

## DISCUSSION

Staphylococci are the main etiological agents of infectious mastitis during lactation. At the species level, *S. aureus* has been traditionally considered the most common agent; however, recent studies have shown the increasing importance of *S. epidermidis* in bovine mastitis and have revealed that its incidence could be even higher than that of *S. aureus* (3, 25, 29). In fact, in the present study, 40% of the women carried *S. aureus* in their milk, while 60% of them harbored *S. epidermidis* isolates. Previously, it had been suggested that coagulase-negative staphylococci should be considered as a possible etiologic agent of mastitis in nursing women since the inoculation of *S. epidermidis* strains isolated from human mastitis into the mammary glands of lactating mice led to clinical and histological signs of mastitis (24). Therefore, the results of the present study confirm that *S. epidermidis* may be an underrated cause of human lactational mastitis.

Independently of the species involved, mastitis-causing

strains usually display two common properties: resistance to methicillin and other antibiotics and a high ability to form biofilms. This explains why this condition uses to be elusive to antibiotherapy and why it usually becomes a recurrent or chronic infection. In fact, ca. 25% of mothers cite such condition as their reason to cease breast-feeding (28). In this context, the development of new strategies based on bacteriotherapy, a practice that makes use of beneficial bacteria to prevent or treat colonization of the host by pathogens (7), as an alternative or complement to antibiotherapy is particularly attractive. In a previous study, we isolated a variety of lactobacillus strains from human milk, including *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714 (10, 12). Subsequent studies revealed that both strains were good probiotic candidates since they reached high survival rates when exposed to the gastrointestinal tract conditions, showed a strong adherence to intestinal cells, stimulate the expression of mucin-encoding genes, produced antimicrobial compounds (lactate, acetate and hydrogen peroxide) in vitro, and displayed in vivo antibacterial properties against pathogenic bacteria (10, 14, 18). The presence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli in breast milk seems especially interesting since it has been reported that lactobacilli with such an ability inhibit the growth of *S. aureus* (17). Because of their anti-infectious properties and breast milk origin, these strains are particularly appealing as a probiotic alternative for the treatment of infectious mastitis. In addition, it has already been shown that lactic acid bacteria isolated from human milk have potential use as bacteriotherapeutic agents in preventing neonatal and maternal breast infections caused by *S. aureus* (6).

In the present study, reductions of approximately 1.5- to 2-log cycles in the milk staphylococcal counts led to a rapid improvement of the mastitic condition. The final staphylococcal count was 2 to 3 log<sub>10</sub> CFU/ml, and this number has been reported as a normal and acceptable staphylococcus load in milk of healthy women (6, 28). The fact that, after the probiotic treatment, *L. salivarius* CECT5713 and *L. gasseri* CECT5714 were the unique lactobacilli detected in milk is not surprising since the *Lactobacillus* composition of infant feces and breast milk is host specific and usually includes a low number of lactobacillus species (6, 11, 12); for example, the examination of *Lactobacillus* gut colonization in 112 breast-fed infants showed that during the first 6 months of life, 26% of them had no lactobacilli, 37% carried a single strain, 26% two strains, and only 11% three or more strains (1). *L. salivarius* CECT 5713 was the strain predominant in milk after the probiotic

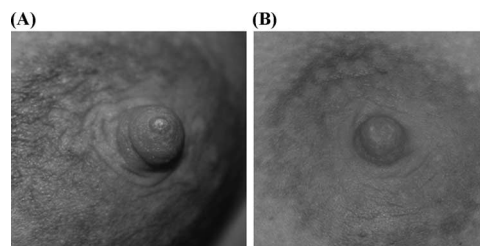


FIG. 2. Mammary areola of one of the probiotic group women at day 0, in which redness and a nipple crack are clearly visible (A) and at day 14 show a normal appearance (B).

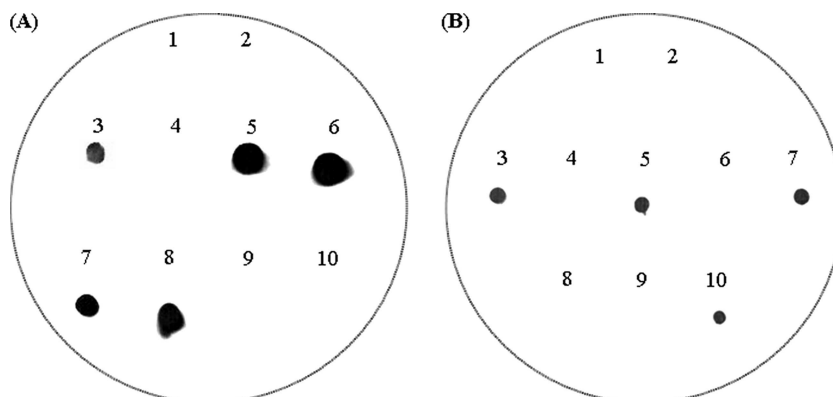


FIG. 3. Colony hybridization analysis of isolates obtained from the milk sample of woman 1 (probiotic group) at day 30 using either an *L. salivarius*-specific (A) or an *L. gasseri*-specific probe (B). (A) Spots: 1, *L. gasseri* CECT5714; 3, *L. salivarius* CECT5713; 5, 6, 7, and 8, positive isolates belonging to the species *L. salivarius*; 2, 4, 9, and 10, negative isolates that were identified as *Staphylococcus* spp. (B) Spots: 1, *L. salivarius* CECT5713; 3, *L. gasseri* CECT5714; 5, 7, and 10, positive isolates belonging to the species *L. gasseri*; 2, 4, 6, 8, and 9, negative isolates (*Staphylococcus* spp.).

treatment. Studies with other *L. salivarius* strains in animal models and clinical trials have demonstrated their probiotic function and, particularly, their anti-inflammatory effects (4, 16, 22). The combination of anti-infectious and anti-inflammatory properties may explain the effect of the probiotic treatment in the present study.

Lactobacilli present in the maternal gut can cross the intestinal epithelium and reach the mammary gland through an endogenous route, the enteromammary pathway, which is responsible for the abundance of elements of the immunological system in human milk. It has been demonstrated that dendritic cells can penetrate the gut epithelium to take up noninvasive bacteria directly from the gut lumen (20). Once associated with gut-associated lymphoid tissue cells, live noninvasive bacteria can spread to other locations since there is a circulation of lymphocytes within the mucosal associated lymphoid system. Bacterium-stimulated cells move from the intestinal mucosa to colonize distant mucosal surfaces, such as those of the respiratory and genitourinary tracts, salivary and lachrymal glands and, most significantly, that of the lactating mammary gland. In fact, up to 16 lactobacillus species, including *L. gasseri* and *L.*

*salivarius*, have been previously isolated from the blood of healthy people (26). Such enteromammary bacterial circulation has been confirmed recently (19) and would explain the beneficial effect observed in the present study since no lactobacilli could be isolated from breast skin of any women of the probiotic group (data not shown), which rules out the hypothesis of a direct fecal contamination of the breast.

The results obtained here suggest that *L. salivarius* CECT 5713 and *L. gasseri* CECT5714 can be used as an effective alternative to antibiotics for the treatment of infectious mastitis during lactation. Therefore, in the coming months we will begin a large multicentric trial to confirm the effect and, in addition, study a potential preventive effect in pregnant women with a previous history of lactational mastitis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the FUN-C-FOOD (Consolider-Ingenio 2010) and AGL2007-62042 projects from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

We are grateful to S. Ferrer (Universidad de Valencia, Valencia, Spain) for assistance in PFGE analyses and to the Association "Amamantar" (Avilés, Asturias) for support in the collection of the samples.

#### REFERENCES

- Ahrné, S., E. Lönnemark, A. E. Wold, N. Aberg, B. Hesselmar, R. Saalman, I. L. Strannegård, G. Molin, and I. Adlerberth. 2005. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes Infect.* 7:1256–1262.
- Chagnaud, P., K. Machinis, L. A. Coutte, A. Marecat, and A. Mercenier. 2001. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* 44:139–148.
- dos Santos Nascimento, J., P. C. Fagundes, M. A. de Paiva Brito, K. R. dos Santos, and M. do Carmo de Freire Bastos. 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 106:61–71.
- Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl.):386S–392S.
- Foxman, B., H. D'Arcy, B. Gillespie, J. K. Bobo, and K. Schwartz. 2002. Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breast-feeding women in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 155:103–114.
- Heikkilä, M. P., and P. E. J. Saris. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* 95:471–478.
- Huovinen, P. 2001. Bacteriotherapy: the time has come. *BMJ* 323:353–354.
- Kullen, M. J., R. B. Sanozy-Dawes, D. C. Crowell, and T. R. Klaenhammer.

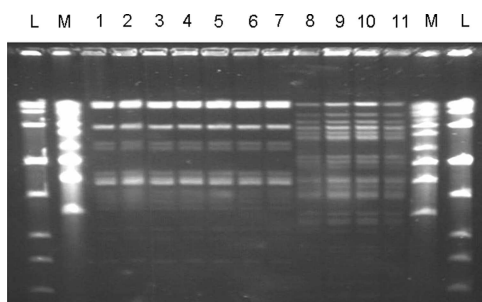


FIG. 4. PFGE patterns of *Sma*I-digested genomic DNA from *L. salivarius* CECT5713 (lane 1), six milk isolates that hybridized with the *L. salivarius* probe in the colony hybridization assay (lanes 2 to 7), *L. gasseri* CECT5714 (lane 8), and three milk isolates that hybridized with the *L. gasseri* probe in the hybridization assay (lanes 9 to 11). L and M represent the standards LowRange PFG and MidRange PFG, respectively.

2005. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* **89**:511–516.
9. Lawrence, R. A., and R. M. Lawrence. 2005. Breastfeeding: a guide for the medical profession, 6th ed. Mosby, St. Louis, MO.
10. Martín, R., E. Jiménez, M. Olivares, M. L. Marín, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int. J. Food Microbiol.* **112**:35–43.
11. Martín, R., H. G. H. J. Heilig, E. G. Zoetendal, E. Jiménez, L. Fernández, H. Smidt, and J. M. Rodríguez. 2007. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res. Microbiol.* **158**:31–37.
12. Martín, R., S. Langa, C. Reviriego, E. Jiménez, M. L. Marín, J. Xaus, and J. M. Rodríguez. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* **143**:754–758.
13. Martín, R., S. Langa, C. Reviriego, E. Jiménez, M. L. Marín, M. Olivares, J. Boza, J. Jiménez, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **15**:121–127.
14. Martín, R., M. Olivares, M. L. Marín, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez. 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* **21**:8–17.
15. Martínez, M. I., E. Rodríguez, M. Medina, P. E. Hernández, and J. M. Rodríguez. 1998. Detection of specific bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization. *J. Appl. Microbiol.* **84**:1099–1103.
16. McCarthy, J., L. O'Mahony, L. O'Callaghan, B. Sheil, E. E. Vaughan, N. Fitzsimons, J. Fitzgibbon, G. C. O'Sullivan, B. Kiely, J. K. Collins, and F. Shanahan. 2003. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* **52**:975–980.
17. Ocaña, V. S., A. A. Pesce de Ruiz Holgado, and M. E. Nader-Macias. 1999. Selection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Curr. Microbiol.* **38**:279–284.
18. Olivares, M., M. P. Díaz-Ropero, R. Martín, J. M. Rodríguez, and J. Xaus. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol.* **101**:72–79.
19. Perez, P. F., J. Doré, M. Leclerc, F. Levenez, J. Benyacoub, P. Serrant, I. Segura-Roggero, E. J. Schiffrin, and A. Donnet-Hughes. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* **119**:e724–e732.
20. Rescigno, M., M. Urbano, B. Valsazina, M. Francoloni, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2**:361–367.
21. Riordan, J. M., and F. H. Nichols. 1990. A descriptive study of lactation mastitis in long-term breast-feeding women. *J. Hum. Lact.* **6**:53–58.
22. Sheil, B., J. McCarthy, L. O'Mahony, M. W. Bennett, P. Ryan, J. J. Fitzgibbon, B. Kiely, J. K. Collins, and F. Shanahan. 2004. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* **53**:694–700.
23. Song, Y., N. Kato, C. Liu, Y. Matsumiya, H. Kato, and K. Watanabe. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**:167–173.
24. Thomsen, A. C., S. C. Mogensen, and F. Love Jepsen. 1985. Experimental mastitis in mice induced by coagulase-negative staphylococci isolated from cases of mastitis in nursing women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **64**:163–166.
25. Thorberg, B. M., I. Kuhn, F. M. Aarestrup, B. Brandstrom, P. Jonsson, and M. L. Danielsson-Tham. 2006. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet. Microbiol.* **115**:163–172.
26. Vankerckhoven, V. V., T. A. Autgaerden, G. Huys, M. Vancanneyt, J. Swings, and H. Goossens. 2004. Establishment of the PROSAFE collection of probiotic and human lactic acid bacteria. *Microbial Ecol. Health Dis.* **16**:131–136.
27. Wall, R. J., A. M. Powell, M. J. Paape, D. E. Kerr, D. D. Bannerman, V. G. Pursel, K. D. Wells, N. Talbot, and H. W. Hawk. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.* **23**:445–451.
28. World Health Organization. 2000. Mastitis: causes and management. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
29. Zhang, S., and C. W. Maddox. 2000. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect. Immun.* **68**:1102–1108.

## **IX. DISCUSIÓN GENERAL**



## IX.1. ¿ES ESTÉRIL EL FETO EN EL ÚTERO?

Uno de los primeros estudios sobre la colonización bacteriana del intestino en los recién nacidos sostenía que ésta se iniciaba durante el paso del feto por el canal del parto, por contacto con la microbiota vaginal y fecal de la madre y que, por lo tanto, el feto era estéril mientras se encontraba en el útero materno (Tissier, 1900). Esa teoría ha sido ampliamente aceptada desde entonces y todavía muchos estudios recientes sobre la microbiota intestinal de los recién nacidos comienzan afirmando que en condiciones normales el feto es estéril en el útero, a pesar de la ausencia de estudios al respecto (Falagas et al., 2007; Hufnagel et al., 2007; Palmer et al., 2007; Schwiertz et al., 2003). Es más, la identificación de microorganismos en el líquido amniótico suele ser preocupante, por su asociación con partos prematuros y complicaciones tanto en la madre como en el recién nacido (Gómez et al., 1995). Debe resaltarse que la mayor parte de los estudios microbiológicos realizados en este tipo de muestras se corresponden con casos de infección o ruptura prematura de membranas (Hillier et al., 1993; Kim et al., 2003; Romero et al., 1992; Seong et al., 2008). Sólo en contadas ocasiones estos estudios se han llevado a cabo en embarazos sin ninguna complicación (Bearfield et al., 2002; Fanaro et al., 2003; Hiti et al., 1997; Hufnagel et al., 2007; Pettker et al., 2007; Rouse et al., 2003; Satokari et al., 2008; Steel et al., 2005).

El empleo de métodos microbiológicos tradicionales, como por ejemplo el cultivo en placa y la tinción de Gram, tiene grandes limitaciones para la detección de bacterias en líquido amniótico y corioamnion. Estas muestras tienen condiciones poco favorables para el crecimiento de microorganismos, como escasez de hierro, e incluso cuentan de forma natural con diversos péptidos antimicrobianos (Ahn et al., 2004; Espinoza et al., 2003; Soto et al., 2007; Thadepalli et al., 1977). Por ello, es previsible que los microorganismos se encuentren en baja concentración y, en muchos casos, por debajo del límite de detección de estos métodos. Por otra parte, en las condiciones empleadas en el laboratorio sólo puede aislarse una pequeña parte, en algunos casos no más del 1%, de los microorganismos presentes en ecosistemas de muy diversos ambientes (suelos, agua, muestras biológicas), denominándose el resto como “no cultivables” (Bearfield et al., 2002; Rappé y Giovannoni, 2003).

La aplicación de técnicas moleculares independientes de cultivo ofrece grandes ventajas en estos casos, dada su mayor sensibilidad. Así, por ejemplo, en varios estudios se han detectado bacterias mediante PCR en muestras de líquido amniótico de mujeres cuyas membranas estaban intactas, a pesar de que no se observó crecimiento bacteriano en los medios de cultivo empleados (Bearfield et al., 2002; Hitti et al., 1997; León et al., 2007; Oyarzún et al., 1998). Este tipo de técnicas ha permitido detectar recientemente DNA de *Bifidobacterium* spp. en 33 placentas de mujeres sanas, de un total de 34 analizadas, y de *Lb. rhamnosus* en 31, mediante PCR, aunque los cultivos realizados de estas mismas muestras fueron negativos (Satokari et al., 2008). Sin embargo, las técnicas moleculares independientes de cultivo tienen el inconveniente de no distinguir entre bacterias viables y no viables.

El resultado obtenido en esta Tesis al realizar el recuento bacteriano en muestras de sangre de cordón umbilical, tras un enriquecimiento en medio BHI, osciló entre 30 y 300 ufc/ml (Jiménez et al., 2005). Esto es indicativo de que la concentración inicial era muy baja y de la necesidad de utilizar técnicas moleculares para comprender algunos aspectos microbiológicos del embarazo.

La presencia en líquido amniótico de ciertos micoplasmas y bacterias Gram-negativas asociadas con la microbiota oral y la detección por PCR de DNA de determinadas bacterias, como *Ureaplasma urealyticum*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*, se ha relacionado con posibles complicaciones durante el embarazo (Bearfield et al., 2002; León et al., 2007; Yoon et al., 2003). Sin embargo, las madres que participaron en este estudio gozaron de embarazos saludables y en ningún caso se aislaron bacterias Gram-negativas de las muestras de sangre de cordón, a pesar de que las condiciones de cultivo y enriquecimiento eran excelentes para este tipo de bacterias (Jiménez et al., 2005). Cabe destacar que cada vez son más numerosos los estudios que han puesto de manifiesto que la presencia de un número moderado de bacterias en el líquido amniótico y corioamnion es un hecho absolutamente normal, que no está asociado con partos prematuros (Pettker et al., 2007; Oyarzún et al., 1998; Romero et al., 2006; Steel et al., 2005). Se ha argumentado que, puesto que los microorganismos se encuentran de forma natural en la cavidad uterina, es muy probable que estén presentes en el momento de la implantación, que

permanezcan en la cavidad endometrial y que sólo surgirá un proceso patológico si la microbiota comensal es invasiva y el huésped está predispuesto (Romero et al., 2007).

## IX.2. DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y MECONIO

La diversidad bacteriana en las muestras de sangre de cordón umbilical y de meconio analizadas en esta Tesis fue limitada, entre 1 y 3 especies distintas por muestra en el caso de la sangre de cordón umbilical y entre 1 y 5 en meconio (Jiménez et al., 2005 y 2008d). Todos los aislados identificados de la sangre de cordón umbilical pertenecían a las especies *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *S. epidermidis* y *Streptococcus sanguinis*. En el meconio la diversidad bacteriana fue mayor, con unas 15 especies distintas, siendo *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis* y *E. coli* las predominantes. No puede descartarse que la limitada diversidad bacteriana observada en las muestras estudiadas sea consecuencia de las condiciones y medios de cultivo empleados para el aislamiento.

Todas estas especies, en particular enterococos, estafilococos coagulasa-negativos, estreptococos y enterobacterias, están presentes de forma natural desde el primer día de vida en el intestino de niños nacidos a término y prematuros (Adlerberth et al., 2006; Balmer y Wharton, 1989; Borderon et al., 1996; Hufnagel et al., 2007; Lundquist et al., 1985; Palmer et al., 2007; Park et al., 2005; Pettker et al., 2007; Rouse et al., 2003; Sakata et al., 1985; Schwiertz et al., 2003). Estos grupos bacterianos se consideran comensales en hospedadores sanos y seguramente jueguen un importante papel biológico en el intestino neonatal.

Un estudio reciente realizado por DiGiulio et al. (2008) sobre la caracterización microbiológica del líquido amniótico, empleando simultáneamente métodos de cultivo y PCR en 25 muestras, logró identificar 17 especies bacterianas y una de levadura (*C. albicans*). Seis de las especies bacterianas se detectaron por ambos métodos: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* sp., *St. agalactiae*, *Lactobacillus* sp., *Prevotella* sp. y *F. nucleatum*; cuatro especies se detectaron sólo con técnicas de cultivo:



*Staphylococcus* sp. coagulasa-negativo, *Bacillus* sp., *Peptostreptococcus* sp. y *Gardnerella vaginalis*; y, finalmente, 6 especies sólo se encontraron mediante PCR: *St. mitis*, *Bacteroidetes* sp., *Delftia acidovorans*, *Neisseria cinerea*, *Sneathia sanguinegens* y *Leptotrichia amnionii*. Esta última técnica reveló la existencia de DNA de un filotipo perteneciente a una nueva especie, y probablemente a un nuevo género, de fusobacterias. En otros estudios sobre la microbiota del líquido amniótico se ha detectado no sólo la presencia de algunas de las bacterias anteriormente citadas, sino también de *E. coli*, *St. agalactiae*, *S. aureus*, *H. influenza*, *Cl. perfringens*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *P. acnes* (Gardella et al., 2004; Markenson et al., 1997; Oyarzún et al., 1998; Romero et al., 2006).

En definitiva, estos hallazgos ponen de manifiesto que la cavidad amniótica debe considerarse un nicho ecológico escasamente explorado que alberga una diversidad de microorganismos mucho mayor de la que se suponía (DiGulio et al., 2008). Parte de esta microbiota podría estar protegida frente a elementos adversos, como leucocitos o péptidos antimicrobianos, mediante la formación de *biofilms* en los que las células se mantienen en agregados mediante la producción de polímeros extracelulares (Steele et al., 2005). Esto explicaría el hecho de que estas bacterias no induzcan una respuesta inflamatoria y la dificultad de obtener cultivos positivos con las muestras de líquido amniótico (Romero et al., 2007).

### **IX.3. RELEVANCIA DE LAS ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y MECONIO**

Las especies aisladas con mayor frecuencia en las muestras de sangre de cordón umbilical y de meconio fueron *E. faecium* y *E. faecalis*, respectivamente (Jiménez et al., 2005 y 2008d). Este hallazgo no debe extrañar, puesto que los enterococos se encuentran entre los primeros colonizadores del tracto gastrointestinal de neonatos, siendo las especies predominantes *E. faecium*, *Enterococcus casseliflavus* y *E. faecalis* (Hufnagel et al., 2007; Mackie et al., 1999; Reviriego et al., 2005; Schwiertz et al., 2003). Además, recientemente se ha demostrado que determinadas cepas de *E. faecalis* aisladas de heces de niños (con 3 días o 1 mes de edad) modulan la inmunidad en la

mucosa intestinal. Esta regulación depende de la interacción de los carbohidratos de la pared celular bacteriana con receptores de las células intestinales y la supresión de la expresión de algunos TLRs (Are et al., 2008; Wang et al., 2008).

Algunas cepas de enterococos son patógenos oportunistas y pueden causar infecciones nosocomiales en neonatos y pacientes con otras enfermedades predisponentes (Kayser, 2003). Sin embargo, la presencia de enterococos en recién nacidos sanos no desencadena el desarrollo de infección debida a estas especies ni otras complicaciones como enterocolitis necrotizante, hemorragia intracerebral o displasia broncopulmonar (Hufnagel et al., 2007; Jiménez et al., 2005 y 2008d; Reviriego et al., 2005). Por otra parte, no se debe olvidar que algunas cepas de enterococos se han empleado como probióticos para humanos, por ejemplo *E. faecium* SF68 (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basilea, Suiza). Esta cepa ha demostrado su eficacia en diversos estudios de diarreas asociadas a antibioterapia (Wunderlich et al., 1989), diarreas infantiles (Bellomo et al., 1980) y diarreas agudas en adultos (Buydens y Debeuckelaere, 1996). Es más, en algunos países, como Corea, los productos probióticos elaborados con enterococos representan el 50% del mercado de este tipo de productos (Lee et al., 2008).

Otra de las especies halladas en las muestras de sangre de cordón umbilical es *P. acnes* (Jiménez et al., 2005). Esta especie fue la que se aisló con mayor frecuencia (41% del total de los aislados anaerobios) en un estudio en el que, para comprobar si los lavados vaginales con clorhexidina previos al parto reducían las infecciones fetales, neonatales y maternas, se analizaron 176 placentas (93 del grupo control y 83 del grupo experimental) empleando técnicas de cultivo (Rouse et al., 2003). Las bacterias del género *Propionibacterium* se caracterizan por producir ácidos grasos de cadena corta, principalmente ácido propiónico y ácido acético. Estos ácidos se encuentran entre los principales componentes citotóxicos secretados por bacterias y, de hecho, se han utilizado en la eliminación de carcinomas colorrectales por su capacidad de inducir apoptosis (Jan et al., 2002). Otro rasgo destacable de estas bacterias es la producción de cianocobalamina y otros componentes útiles para su hospedador, que intervienen en la modulación de la microbiota intestinal y que han determinado su inclusión entre los probióticos (Bougle et al., 1999; Mantere-Alhonen, 1995). Como ya se ha indicado

para los enterococos, aunque *P. acnes* es una especie potencialmente patógena (Kiatpapam y Murooka, 2002), en este estudio no hubo ningún indicio de infección causada por su presencia (Jiménez et al., 2005).

Los estafilococos fueron el segundo grupo bacteriano predominante tanto en las muestras de sangre de cordón umbilical como en las de meconio y, en concreto, *S. epidermidis* destacó como la especie aislada con mayor frecuencia (Jiménez et al., 2005 y 2008d). Puesto que *S. epidermidis* es uno de los principales causantes de infecciones neonatales (Isaacs et al., 1996; Mehr et al., 2002), las cepas estafilocócicas presentes en el meconio, y luego las de la leche materna, podrían competir con otras cepas patógenas procedentes del ambiente hospitalario con éxito. Además, *S. epidermidis* también podría estar implicada en el desarrollo del GALT en presencia de otras bacterias, como se ha demostrado en conejos axénicos (Rhee et al., 2004).

Los estreptococos, que también se aislaron de algunas muestras de sangre de cordón umbilical y de meconio, igualmente podrían proteger frente a la adquisición de patógenos en neonatos expuestos a un ambiente hospitalario. Los estreptococos viridans inhiben en niños la colonización oral por *S. aureus* resistentes a la meticilina (Uehara et al., 2001). En concreto, la especie *St. sanguinis* se detecta en la cavidad oral de niños inmediatamente después del parto (Caufield et al., 2000). Además las cepas de *St. sanguinis* aisladas de cavidad bucal tienen capacidad antagonista en enfermedades periodontales y caries (Becker et al., 2002). Por ello, esta especie se ha propuesto como probiótico para prevenir las caries mediante su implantación artificial en la cavidad oral, incluyendo medidas que fomenten la transmisión madre-hijo (Caufield et al., 2000). En algunas afecciones infantiles, como la otitis media secretora de larga duración, se ha demostrado que *St. sanguinis* es mucho más efectiva como probiótico que *Lb. rhamnosus* cuando se administran en forma de *spray* nasal (Skovbjerg et al., 2009). Por otra parte, la presencia de estreptococos viridans parece ser un rasgo distintivo del tracto gastrointestinal de niños sanos respecto al de niños con dermatitis atópica (Kirjavainen et al., 2001).

En las muestras de sangre de cordón umbilical analizadas no pudo ponerse de manifiesto la presencia de *E. coli* (Jiménez et al., 2005), a pesar de que esta especie se

encuentra entre los primeros colonizadores del tracto gastrointestinal (Adlerberth et al. 1991; Favier et al., 2002 y 2003). En cambio, fue una de las especies predominantes en las muestras de meconio (Jiménez et al., 2008d). La presencia de esta bacteria en el meconio de neonatos no debe causar alarma porque son habitantes normales del intestino humano, aunque ciertas cepas de esta especie son patógenas. El importante papel de *E. coli* en el intestino se ha ratificado en diferentes estudios en los que se ha empleado la cepa Nissle 1917 (O6:K5:H1) como probiótico oral en niños a término y prematuros. En dichos estudios se ha demostrado que *E. coli* Nissle 1917 reduce el número y la incidencia de infecciones, estimula la respuesta humoral y celular específicas e induce la inmunidad natural inespecífica (Altenhoefer et al., 2004; Henker et al., 2007 y 2008). Aunque se desconoce la ruta, Tannock et al. (1990) han descrito la transmisión madre-hijo de enterobacterias.

La cepa comensal *E. coli* A0 34/86 (O83:K24:H31) también se ha empleado con éxito durante más de tres décadas como probiótico para la prevención y el tratamiento de infecciones nosocomiales y diarreas en clínicas pediátricas checas. La secuenciación de su genoma completo ha revelado la existencia de genes específicos responsables de la capacidad de esta cepa para colonizar el intestino y competir con éxito frente a los patógenos. Entre estos genes se incluyen algunos implicados en el metabolismo de gluconato y manosa, la adhesión, la invasión y los sistemas de restricción/modificación (Hejnova et al., 2005). Sorprendentemente en esta cepa comensal y probiótica se encontraba también un amplio rango de genes considerados como “factores de virulencia” en las enterobacterias, como adhesinas, hemolisina  $\alpha$ , el factor citotóxico necrotizante y otros pertenecientes a islas de patogenicidad de otras cepas patógenas. Estos investigadores sugieren que todos estos factores pueden muy bien contribuir al éxito de la cepa en la colonización del intestino y que no se deberían considerar como factores de virulencia en el sentido que se emplean en otras cepas, sino como factores de colonización (Hejnova et al., 2005). En definitiva, queda claro que es muy difícil trazar una frontera clara entre la virulencia y el comensalismo.

La presencia de todas estas bacterias comensales en la sangre de cordón umbilical y en el meconio podría explicar el origen de estos primeros colonizadores del intestino infantil. De esta forma, el intestino fetal iniciaría su adaptación a su futura

vida extrauterina, en la que estará expuesto a un gran número de antígenos. Este contacto previo al nacimiento con las bacterias gastrointestinales actuaría como un primer e intenso estímulo para iniciar el desarrollo del GALT (Kalliomäki et al., 2001; Noverr y Huffnagle, 2004; Rhee et al., 2004). Después de su nacimiento, serán el calostro y la leche materna las principales fuentes de estas bacterias comensales para el niño (Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003, 2007a; Reviriego et al., 2005).

La importancia del tránsito a través de la vagina en la colonización intestinal del recién nacido se ha cuestionado en varios estudios, en los que se ha demostrado que tiene una influencia mínima (Martín et al., 2003, 2007b; Matsumiya et al., 2002). Es interesante que se haya descrito la presencia de estreptococos, estafilococos y propionibacterias en muestras de líquido amniótico, placenta, sangre de cordón umbilical y/o meconio de mujeres sin episodios de infección o inflamación y niños sanos nacidos tanto por cesárea (Bearfield et al., 2002) como por parto (Hufnagel et al., 2007; Pettker et al., 2007; Hiti et al., 1997; Rouse et al., 2003).

#### **IX.4. ORIGEN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y MECONIO**

Se han propuesto varias rutas por las cuales los microorganismos podrían acceder a la cavidad amniótica: por ascensión vaginal, atravesando la placenta por vía sanguínea, por invasión desde la cavidad peritoneal o accidentalmente durante procedimientos invasivos (Romero et al., 1992; Pettker et al., 2007). El aislamiento de enterococos y estafilococos de sangre de cordón umbilical en mujeres y niños sanos, así como la detección de DNA de bifidobacterias y lactobacilos en placenta humana, confirma que el paso a través de la placenta es una de las rutas que utilizan las bacterias comensales hacia la cavidad amniótica (Jiménez et al., 2005; Satokari et al., 2008). De hecho, muchas de estas especies bacterianas también se aíslan del meconio de neonatos sanos, a pesar de que tradicionalmente se ha considerado que este material biológico era estéril (Jiménez et al., 2008d).

Pero, ¿de dónde proceden esas bacterias presentes en la sangre de cordón umbilical y el meconio? En 1980, Kornman y Loesche describieron que las bacterias presentes en la cavidad oral podían llegar al líquido amniótico a través de la circulación sanguínea, especialmente en casos de gingivitis o periodontitis durante el embarazo. Recientemente se ha comprobado que la composición de la microbiota oral influye en el desarrollo del embarazo (Dasanayake et al., 2005). En este estudio, en el que participaron 300 mujeres embarazadas, la presencia de *Actinomyces naeslundii* estaba ligada a niños prematuros y con bajo peso al nacer, mientras que la presencia de otras bacterias, como por ejemplo lactobacilos, estaba asociada a niños nacidos a término y con un peso algo superior. Estos autores propusieron que las bacterias de origen oral podrían alcanzar el ambiente uterino a través del torrente sanguíneo e influir en el desarrollo del parto (Dasanayake et al., 2005). Al perfundir la sangre materna en el espacio intervelloso de la placenta, los microorganismos presentes en la circulación materna pueden ganar acceso a las vellosidades de la parte fetal (Redline, 2004). Hay que tener en cuenta que en la última etapa del embarazo la separación entre ambas circulaciones, la materna y la fetal, es una simple capa de células, lo cual facilitaría enormemente el paso de bacterias.

Las especies bacterianas aisladas de sangre de cordón umbilical y de meconio (*E. faecium*, *P. acnes*, *S. epidermidis*, *St. sanguinis* y *E. coli*) se encuentran entre las que suelen estar asociadas con la microbiota oral y gastrointestinal de la madre. Estas bacterias podrían diseminarse desde el tracto digestivo hacia lugares extradigestivos gracias a las células dendríticas, que pueden penetrar el epitelio y tomar bacterias directamente del lumen intestinal (Rescigno et al., 2001; Langa, 2006). Una vez en el interior o pegadas a las células dendríticas, o a macrófagos, las bacterias podrían llegar a otras mucosas a través del torrente sanguíneo empleando la circulación de las células del sistema inmunitario en el MALT. Usando esta vía, una cepa comensal administrada oralmente a ratones llegó a alcanzar el bazo (Rescigno et al., 2001). Las células estimuladas por la presencia de antígenos en el intestino se mueven desde la mucosa intestinal hacia otras mucosas distantes, como la del tracto genitourinario (Roitt, 2001). En consecuencia, no debe extrañar que una cepa de *E. faecium* administrada oralmente a una ratona gestante llegue al líquido amniótico y colonice el intestino fetal (Jiménez et al., 2005; 2008d). Este resultado puede tener repercusiones prácticas muy

importantes ya que abre la posibilidad de modular la microbiota intestinal del recién nacido mediante la administración de probióticos durante el embarazo.

Estudios en animales de experimentación han confirmado que un cambio en la microbiota intestinal materna tiene un marcado efecto en la colonización y desarrollo intestinal de su progenie (Fåk et al., 2008a y 2008b). Esta misma estrategia se ha probado en mujeres embarazadas, donde también parece tener validez. La administración oral de un probiótico (*Lb. rhamnosus* GG) durante el embarazo no sólo causa la colonización del TGI materno, sino también la de sus hijos sin necesidad de que éstos ingieran directamente por vía oral el probiótico. Es de destacar que esta colonización del intestino infantil es bastante estable, detectándose la cepa *Lb. rhamnosus* GG en todos los casos durante 6 meses y en algunos niños incluso al cabo de un año (Schultz et al., 2004).

#### **IX.5. EL CALOSTRO Y LA LECHE HUMANA CONTIENEN BACTERIAS EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS**

El calostro y la leche materna confieren al recién nacido una notable protección frente a enfermedades infecciosas (Morrow y Rangel, 2004). Este efecto protector es debido a la acción combinada de algunos de sus componentes, como Igs, células inmunocompetentes, ácidos grasos antimicrobianos, oligosacáridos fucosilados, lisozima, lactoferrina o diversos péptidos antimicrobianos (Newburg, 2005). Muchos de estos componentes pueden inactivar microorganismos potencialmente patógenos de forma individual, aditiva y/o sinérgica (Isaacs, 2005). Además, en los últimos años se ha puesto en evidencia que este fluido biológico es una fuente excelente de bacterias mutualistas y probióticas para el intestino infantil (Martín et al., 2003; Heikkilä y Saris, 2003). Los principales grupos bacterianos aislados hasta la fecha (estafilococos, estreptococos, bacterias lácticas) pueden inhibir el crecimiento de un amplio espectro de bacterias patógenas bien sea por exclusión competitiva y/o a través de la producción de sustancias antimicrobianas, como bacteriocinas, ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno (Beasley y Saris, 2004; Martín et al., 2005; Olivares et al., 2006).

En consecuencia, la leche humana constituye uno de los factores clave en la iniciación y el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato. Se trata de un hallazgo relevante ya que tradicionalmente se ha considerado que la leche materna era estéril, aún a pesar de la inexistencia de trabajos científicos que avalaran tal esterilidad. Tales bacterias pueden desempeñar un papel clave en procesos tan importantes (y, posiblemente, interconectados) como la protección frente a enfermedades infecciosas, la maduración del sistema inmunitario o el desarrollo de funciones cognitivas mediante la activación del sistema vago-cerebro.

Hasta la fecha, los pocos estudios dedicados a aspectos microbiológicos de la lactancia materna se han centrado, casi exclusivamente, en la detección de bacterias potencialmente patógenas en leche almacenada en bancos o en casos de mastitis (Bingen et al., 1992; El-Mohandes et al., 1993; Le Thomas et al., 2001; Ng et al., 2004). Aún son más escasos los estudios sobre la microbiología de la leche humana de mujeres sanas (Gavin y Ostovar, 1977; Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003; West et al., 1979). Todos coinciden en señalar que las bacterias aisladas con mayor frecuencia pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. La reciente aplicación de técnicas moleculares independientes de cultivo ha permitido complementar los datos obtenidos mediante técnicas clásicas de cultivo (Gueimonde et al., 2007; Martín et al., 2007a; Pérez et al., 2007) y ha confirmado la gran influencia de este fluido biológico en la colonización del intestino del neonato, cuya importancia parece ser muy superior a la del tránsito por el canal del parto (Martín et al. 2007b). En cualquier caso, el número de estudios moleculares enfocados en la microbiología de la leche materna y su papel en la colonización del intestino neonatal sigue siendo muy bajo y la progresiva incorporación de estas técnicas irá abriendo nuevas perspectivas en este campo.

Los resultados obtenidos en esta Tesis mediante técnicas de cultivo indican que la diversidad bacteriana en el calostro y la leche humana es una característica individual ya que cada mujer mostró un patrón distinto a las demás (Jiménez et al., 2008a, 2008b). Globalmente, *S. epidermidis* resultó la especie predominante, pero también se aislaron con cierta frecuencia estreptococos, bacterias lácticas (particularmente *E. faecalis*) y otras especies del género *Staphylococcus*. En contraste,



el número de enterobacterias aisladas fue muy bajo. En líneas generales, estos resultados coinciden con los datos proporcionados por estudios previos sobre la diversidad microbiana de la leche humana, independientemente de que estuvieran basados en técnicas clásicas o moleculares (Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2007a; Pérez et al., 2007).

La prevalencia de especies del género *Lactobacillus* fue baja a pesar de que su presencia en la leche humana es un hecho contrastado por la comunidad científica. Existen dos razones que pueden justificar el bajo número de lactobacilos aislados de calostro y leche durante esta Tesis: (1) que no se encuentren (o se encuentren en una concentración inferior al límite de detección) en las muestras analizadas y/o (2) que se trate de cepas no cultivables o difícilmente cultivables con los medios y/o condiciones empleados. Conviene considerar que en este caso se ha tratado de conocer la composición bacteriológica global de estos fluidos biológicos, a diferencia de estudios previos que estaban dedicados exclusivamente al aislamiento de bacterias lácticas (Martín et al., 2003; Heikkilä y Saris, 2003).

#### **IX.6. *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*: LA ESPECIE “REINA” DEL CALOSTRO Y LA LECHE**

Prácticamente, todos los estudios microbiológicos realizados hasta la fecha indican que *S. epidermidis* es la especie bacteriana más representativa en la leche humana; por una parte, está presente en la leche de un porcentaje muy elevado de mujeres, independientemente de su origen, edad y estatus socio-económico o sanitario. Por otra, suele ser la especie que se encuentra en mayor concentración en este fluido. En consecuencia, no es de extrañar que sea también la especie predominante en las heces de niños amamantados y que su presencia constituya un rasgo diferencial de la lactancia materna con relación a la alimentación con fórmulas infantiles. Este hecho sugiere que se trata de una especie con importantes funciones biológicas en el periodo perinatal.

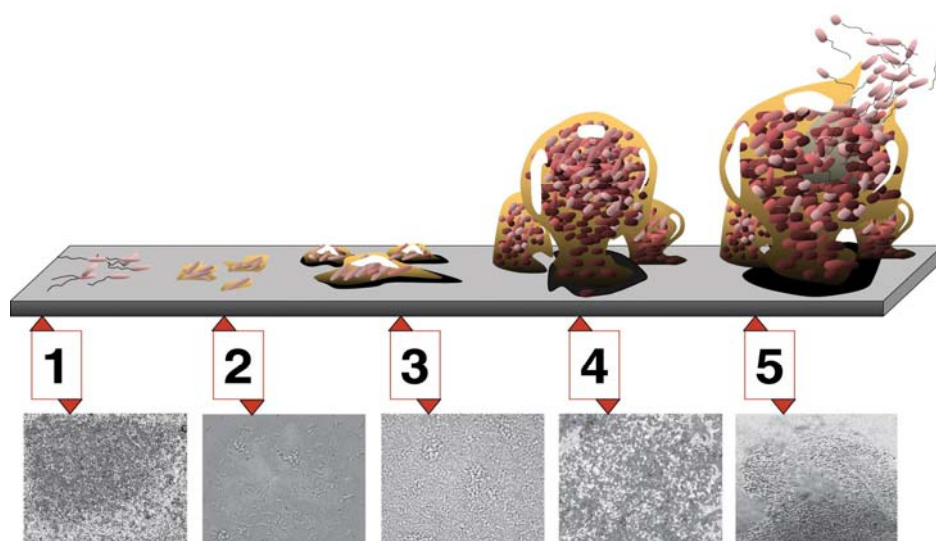
No obstante, resulta igualmente cierto que ciertas cepas (en ciertas circunstancias) se pueden comportar como patógenos. Desde los años 70, *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa-negativos son considerados como agentes etiológicos de una amplia variedad de infecciones, que van desde bacteriemias hasta endocarditis pasando por oftalmitis, osteomielitis e infecciones del tracto urinario (Piette y Verschraegen, 2009). Su importancia es creciente y, de hecho, se ha convertido en la principal causa de infecciones nosocomiales (Ziebuhr et al., 2006); en el ámbito de la Neonatología también se les considera la principal causa de sepsis neonatales, especialmente en prematuros. La secuenciación del genoma de algunas cepas de *S. epidermidis* ha revelado su gran capacidad para persistir en un hospedador incluso en condiciones adversas y, en consecuencia, su predisposición a causar infecciones crónicas y recurrentes (Gill et al., 2005). Entre las propiedades que suelen caracterizar a las cepas potencialmente patógenas destacan dos: (1) la capacidad para formar *biofilms* y (2) la resistencia a antibióticos. Por este motivo, en esta Tesis se analizó la posible presencia de factores de virulencia y la sensibilidad a los antibióticos de los aislados de esta especie, aspectos que se discutirán a continuación.

#### **IX.6.1. Producción de *biofilms***

Un *biofilm* se puede definir como una comunidad microbiana bien estructurada, adherida firmemente a una superficie viva o inerte y rodeada de una matriz polimérica extracelular. Los organismos unicelulares pueden vivir de forma libre (o planctónica) pero, en determinadas circunstancias se produce un cambio radical, catalizado por la percepción de quórum u otros mecanismos que varían dependiendo de la especie en cuestión. En tales circunstancias, cambia la regulación de diversos genes, lo que se suele asociar a importantes modificaciones fenotípicas.

La formación de un *biofilm* se inicia con la unión de células libres a una superficie. Estos primeros colonizadores se adhieren de una forma débil y reversible mediante fuerzas de van der Waals. Si no son separadas inmediatamente de la superficie, las células se anclan de una forma mucho más fuerte empleando sus propias estructuras celulares de adhesión. Estas primeras células facilitan la llegada y permanencia de otras células ya que proporcionan más lugares de adhesión y empiezan

a construir la matriz que mantendrá al *biofilm* firmemente unido. La matriz protege a las células y facilita la comunicación entre ellas a través de diversas señales bioquímicas. Hay algunas especies que no son capaces de unirse por sí mismas a una superficie pero sí a las células predecesoras o a la matriz que se está formando. Una vez que se ha establecido una colonización firme, el *biofilm* crece mediante una combinación de división celular de las células ya adheridas y de reclutamiento de nuevas células. La etapa final de un *biofilm* se conoce como de “desarrollo” y en ella únicamente se producen cambios en su tamaño o forma (Frebourg et al., 2000). Las distintas fases de la formación de un *biofilm* se muestran en la Figura 13.



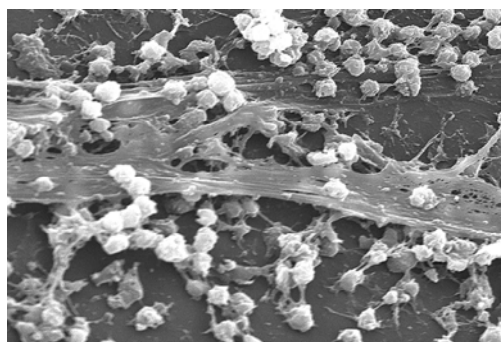
**Fig. 13.** Etapas básicas de la formación de un *biofilm*. 1: unión inicial a la superficie; 2: unión irreversible a la superficie; 3 y 4: maduración; 5: dispersión.

Fuente: Monroe (2007)

Las bacterias que constituyen el *biofilm* son mucho más resistentes frente a detergentes, desinfectantes, antibióticos y elementos del sistema inmunitario que sus correspondientes formas libres (Costerton et al., 1999; Mack et al., 2007). Se ha estimado que la resistencia de una célula del *biofilm* a tales agentes puede ser incluso 1.000 veces mayor en comparación con una célula libre de la misma especie (Stewart y Costerton, 2001). Esta resistencia es tanto pasiva (sucesivas capas de células, matriz extracelular) como activa. En este sentido, se ha observado que los *biofilms* pueden constituir una fuente de nuevos compuestos bioactivos ya que cuando las bacterias

están organizadas de esta forma son capaces de sintetizar sustancias que no pueden producir por sí mismas de forma individual. Por otra parte, la presencia de bacterias en forma de *biofilms* puede dar lugar a falsos negativos en los cultivos tradicionales (Sanderson et al., 2006).

La importancia de los *biofilms* en el desarrollo de enfermedades infecciosas es indudable, habiéndose estimado que pueden estar implicados en un 80% de todas las infecciones (<http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>) incluyendo, por poner algunos ejemplos, infecciones genitourinarias, infecciones asociadas a catéteres (Figura 14), infecciones del oído medio, formación de placa dental y gingivitis, infecciones oculares asociadas a lentes de contacto, endocarditis o infecciones asociadas a dispositivos internos permanentes, como prótesis articulares o válvulas cardíacas.



**Fig. 14.** Estafilococos formando un *biofilm* en un catéter de uso hospitalario.

Fuente: Donlan y Carr (2005)

En el caso de *S. epidermidis*, la primera fase de la adhesión a una superficie requiere la participación de las autolisinas/adhesinas AtlE y Aae, la proteína que une fibrinógeno (Fbe) y la proteína que une fibronectina (Embp) (Mack, 2007). Posteriormente, la formación del *biofilm* propiamente dicho necesita de la intervención de la adhesina intercelular polisacáridica (PIA, del inglés *Polysaccharide Intercellular Adhesion*) codificada en el operón *ica* (*icaADBC*) (O'Gara y Humphreys, 2001) y de la *N*-acetil-glucosamina polimérica (PNAG, del inglés, *Polymeric N-Acetyl-Glucosamine*). Todavía existen lagunas importantes en el conocimiento de la regulación de los genes implicados en la biosíntesis de PIA y PNAG. Por otra parte, se

ha propuesto la participación de otros reguladores de virulencia, como *agr*, *sarA* y *sigmaB*, en la formación de *biofilms* por *S. epidermidis* pero su papel no está claro (Fitzpatrick et al., 2005). Para complicar aún más las cosas, se ha descubierto la existencia de mecanismos de formación de *biofilms* *ica*-independientes, tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis* (O’Gara, 2007). Dado el impresionante abanico de proteínas de superficie que expresan las células de *S. epidermidis*, las investigaciones futuras sobre su papel en el desarrollo de *biofilms* (independientemente o en colaboración con PIA/PNAG) serán particularmente importantes para comprender cómo se forman estas complejas estructuras bacterianas.

La mayoría de las cepas de *S. epidermidis* aisladas de calostro y leche en esta Tesis presentaban los genes *ebp*, *atlE* y *fbe* que codifican las proteínas de adhesión implicadas en la adhesión inicial a superficies (Jiménez et al., 2008a, 2008b). Este hecho podría explicar la persistencia de esta especie en el epitelio que reviste los conductos mamarios y, en consecuencia, su presencia tan frecuente en calostro y leche. Por el contrario, el porcentaje de cepas portadoras del gen *ica* (imprescindible para la biosíntesis de PIA) fue bajo, lo que sugiere que, en general, la virulencia de los aislados de calostro y leche es igualmente baja. Previamente, se ha demostrado la estrecha relación entre la presencia del operon *ica* y la implicación de *S. epidermidis* en infecciones (Vandecasteele et al., 2003). Además, la capacidad para formar *biofilms* parece ser una característica de las cepas que causan mastitis estafilocócicas (Melchior et al., 2006). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha observado que el porcentaje de cepas portadoras del operón *ica* es significativamente mayor entre aquellos implicados en mastitis (33%) que en los aislados de leche de mujeres sanas (11%) (Delgado et al., 2009).

#### **IX.6.2. Resistencia a antibióticos**

La capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico se produce por selección natural a través de mutaciones producidas por azar, pero también puede inducirse artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población. Una vez que se genera la información genética, las bacterias pueden

transmitirse los nuevos genes por transferencia horizontal. Si una bacteria porta varios genes de resistencia, se le denomina multirresistente o, informalmente, superbacteria.

La capacidad de los antibióticos para curar enfermedades infecciosas que en el pasado eran mortales, ha desembocado en la falsa noción de que se trata de "medicamentos milagrosos" con "poderes" que en su mayoría superan a lo que realmente se puede atribuir a sus propiedades farmacológicas. En la mayoría de los países europeos, los antibióticos ocupan el segundo lugar en la lista de medicamentos más usados después de los analgésicos. Por desgracia, ya estamos empezando a pagar el precio por esta forma errónea de entender el uso de los antibióticos. Un uso excesivo, y en muchos casos, inapropiado en medicina humana y veterinaria ha dado lugar a un rápido aumento de la prevalencia de microorganismos resistentes a estos medicamentos. De hecho, muchos de los antiguos antibióticos o bien han dejado de ser eficaces o bien son mucho menos fiables que antes. Por ejemplo, la resistencia a la penicilina o a otros antibióticos beta-lactámicos (que en épocas anteriores era el tratamiento preferido contra las infecciones por estafilococos) es muy común en muchos países.

La resistencia a los antibióticos está provocada por la transferencia de genes de resistencia entre las bacterias de la misma o de diferentes especies. Por lo general, cuanto más se usa un antibiótico específico, mayor es el riesgo de que surja y se extienda la resistencia contra el mismo y, por consiguiente, de que el medicamento sea cada vez menos eficaz. Para evitar una resistencia de este tipo, se desarrollaron nuevos antibióticos con propiedades químicas similares, pero no idénticas, que siguieron siendo eficaces hasta que surgió la resistencia también a ellos. La consecuencia más grave es la aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a diversos antibióticos al mismo tiempo. Las infecciones causadas por estos agentes patógenos con resistencia cruzada suponen un reto especial que acarrea un aumento de las complicaciones clínicas, lo que incluye el riesgo de sufrir una enfermedad grave que hasta la fecha se podría haber tratado con éxito, además de estancias hospitalarias de mayor duración y una factura significativamente más alta para la sociedad. Los niños son más proclives a contraer infecciones respiratorias, pero a causa del uso exagerado de antibióticos para

su tratamiento, las guarderías se están convirtiendo en puntos negros para la aparición y expansión de la resistencia a los antibióticos.

En los últimos años se ha observado un aumento preocupante en el porcentaje de cepas de *S. epidermidis* resistentes a meticilina (MRSE, del inglés *Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis*) tanto en individuos sanos como, particularmente, en aquellos que sufren cualquier tipo de infección estafilocócica (Eady y Cove, 2003). A diferencia de las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA, del inglés *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), los MRSE parecen tener una diversidad genética extrema incluso entre personas que forman parte de una misma comunidad (Manzur et al., 2008). La principal causa de resistencia a meticilina en los estafilococos es la expresión del gen *mecA*. Este gen se localiza en el casete cromosómico SCC (del inglés *Staphylococcal Cassette Chromosome*), que es específico de este género bacteriano y que se puede transferir horizontalmente entre diferentes especies de estafilococos (Hanssen et al., 2004). El uso excesivo de antibióticos de amplio espectro, tales como las cefalosporinas de segunda y tercera generación, acelera en gran medida el desarrollo de resistencia a la meticilina y antibióticos afines.

Por lo que respecta a esta Tesis, únicamente se detectó el gen *mecA* en un porcentaje muy bajo de las cepas de *S. epidermidis* aisladas de leche y calostro (Jiménez et al., 2008a, 2008b). Este hecho también indica que ambos fluidos constituyen una fuente de estafilococos no patógenos ya que la presencia de dicho gen parece ser una característica de las cepas hospitalarias implicadas en infecciones (Hercun et al., 2008). En todos los casos, las cepas *mecA*<sup>+</sup> pertenecían al tipo SCCmec IV, que es característico de los MRSE procedentes de la comunidad (CA-MRSE, del inglés *Community-Acquired MRSE*).

## IX.7. LA LECHE HUMANA ES UNA FUENTE DE BIFIDOBACTERIAS PARA EL INTESTINO INFANTIL

Las bifidobacterias son miembros importantes de la microbiota intestinal humana. Tradicionalmente se ha considerado que la lactancia materna promueve la presencia de bifidobacterias en el intestino infantil ya que proporciona oligosacáridos que actúan como sustratos que favorecen su crecimiento, particularmente en el colon (Agostoni et al., 2004; Salminen e Isolauri, 2006). La leche humana contiene más de 200 oligosacáridos diferentes (Ninonuevo et al., 2006) en una concentración de 15-23 g/l en el calostro y 12-14 g/l en la leche madura (Kunz et al., 1999 y 2000).

Desde los estudios de Tissier (1900), se cree que estas bacterias resultan beneficiosas para el mantenimiento de la salud del hospedador (Tissier 1906). Algunos autores han sugerido que un retraso en la colonización intestinal por bifidobacterias (o un descenso en su concentración) puede hacer que un hospedador sea más sensible a infecciones o alergias (Arvola et al., 2006; Mah et al., 2006). En tales casos, la administración exógena de ciertas cepas, solas o en combinación con bacterias lácticas, parece reducir la incidencia de esos estados (Correa et al., 2005; Kirjavainen et al., 2002; Saavedra et al., 1994; Thibault et al., 2004). Los mecanismos que se han propuesto para explicar el efecto antiinfeccioso de las bifidobacterias son, en general, los mismos que se han citado para las bacterias lácticas: descenso de pH, competición por nutrientes y/o receptores, producción de sustancias antibacterianas e inmunomodulación (Cheikhousseff et al., 2008).

En uno de los estudios que componen esta Tesis Doctoral se pudieron aislar bifidobacterias a partir de 8 de las 23 muestras de leche que se analizaron con ese objetivo (Martín et al., 2008a). Se trata de un resultado particularmente relevante ya que es la primera descripción del aislamiento de bacterias de este género a partir de leche humana. La especie *B. breve* pudo ser aislada en las cuatro muestras en las que se había detectado por PCR-DGGE y qRTi-PCR. El aislamiento de otras especies de bifidobacterias (*Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*) en las muestras de leche donde previamente se había aislado su DNA fue mucho más difícil. Este hecho



se debe a que, por una parte, el aislamiento de muchas cepas de bifidobacterias resulta muy complicado, e incluso imposible, con los medios técnicos disponibles en la actualidad en los laboratorios microbiológicos. Por otra, a que su número puede encontrarse cercano al límite de detección de las técnicas de cultivo. Previamente, la aplicación de técnicas moleculares había revelado la presencia de DNA bifidobacteriano en leche humana (Gueimonde et al., 2007; Pérez et al., 2007) pero no se había conseguido el aislamiento de estas bacterias. También resulta relevante la observación de que ciertas especies se pudieran encontrar tanto en la leche como en las heces de varias parejas madre-hijo. Este hecho sugiere que, al igual que sucede con las bacterias lácticas, la leche humana es una fuente importante de bifidobacterias para el intestino infantil.

#### **IX.8. INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DE NIÑOS RECIÉN NACIDOS**

En la última década se ha puesto claramente de manifiesto que debemos considerarnos como un supraorganismo cuyas mucosas están colonizadas por muchos miembros de los tres dominios de la vida (*Eucaria*, *Arquea* y *Bacteria*) que llevan a cabo importantes funciones nutritivas, metabólicas, inmunológicas y protectoras para nuestro bienestar (Berg, 1996; Gordon y Pesti, 1971). De hecho, la alteración de nuestra microbiota causa en muchas ocasiones enfermedad (de la Cochetiere et al., 2004; Dicksved, 2008; Lecuit et al., 2004; Ott et al., 2004; Parsonet et al., 1991; Seksik et al., 2003). La mucosa intestinal es la más densamente poblada, con trillones de microorganismos y representación de cientos de especies, que son una pieza clave para muchas funciones, como el funcionamiento equilibrado del sistema inmunitario (Macpherson y Harris, 2004). Aunque se ha hecho un gran esfuerzo para caracterizar la microbiota intestinal humana, su origen es todavía incierto (Palmer et al., 2007). Conocer en profundidad cómo se establece y mantiene una microbiota intestinal “normal” en los recién nacidos puede ser clave para mejorar o aliviar ciertas enfermedades.

Como se ha comentado en el apartado 7.2, se ha aceptado que el desarrollo de la microbiota intestinal del recién nacido es un proceso gradual que depende no sólo de los primeros colonizadores (tipo y número), sino también del momento (pretérmino o a término) y tipo (parto vaginal o cesárea) de nacimiento, del tratamiento con antibióticos y, sobre todo, del tipo de alimentación (Benno et al., 1984; Harmsen et al., 2000; Mackie et al., 1999; Penders et al., 2006; Salminen e Isolauri, 2006). El calostro y después la leche humana son el mejor alimento para el recién nacido por su composición equilibrada de nutrientes, que está perfectamente adaptada a sus necesidades nutritivas. Además, contienen una gran variedad de compuestos bioactivos (Igs, células inmunocompetentes, oligosacáridos, ácidos grasos, lisozima, lactoferrina y péptidos antimicrobianos) y microorganismos fundamentales para la iniciación de la colonización infantil y el desarrollo y mantenimiento de la microbiota intestinal (Donovan, 2006; Hamosh, 2001; Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003, 2007a y 2007b). Las fórmulas infantiles disponibles actualmente se asemejan mucho a la composición nutritiva de la leche materna, pero carecen de la gran mayoría de los elementos con actividad biológica anteriormente citados. Por lo tanto, es lógico pensar que el tipo de alimentación va a tener una gran influencia en la microbiota intestinal infantil y, de hecho, ha sido uno de los factores más estudiados tanto con técnicas clásicas de cultivo como con técnicas moleculares.

En general, los estudios realizados concluyen que en los recién nacidos alimentados exclusivamente con leche materna no hay una gran diversidad microbiana en la colonización intestinal inicial y que las bifidobacterias son el principal tipo dominante, junto con algunas bacterias anaerobias facultativas, como los lactobacilos (Benno et al., 1984; Favier et al., 2002; Penders et al., 2006; Stark et al., 1982). Sin embargo, en algunos casos no se han encontrado bifidobacterias en esta etapa o no eran el grupo dominante (Hall et al., 1990; Hopkins et al., 2005). En cambio, en los niños alimentados con leche de fórmula desde muy temprana edad se observa una mayor variedad de géneros bacterianos que incluye, además de las bifidobacterias, otros anaerobios obligados y facultativos como bacteroides, clostridios y enterobacterias (Fanaro, 2003; Favier et al., 2002 y 2003; Harmsen et al., 2000). En cualquier caso, la introducción de la alimentación complementaria es un punto crítico en el proceso de colonización y señala el momento en que la microbiota intestinal

comienza a parecerse más a la de un adulto, en la que claramente predominan las bacterias pertenecientes al género *Bacteroides* y al grupo de los Firmicutes (Favier et al., 2002; Palmer et al., 2007). Un rasgo importante, y ampliamente aceptado, de la colonización intestinal en los niños es el carácter individual del espectro bacteriano y su estabilidad en el tiempo, ya que la mayoría de los grupos taxonómicos persisten durante semanas o meses (Palmer et al., 2007).

Estudios más recientes han mostrado que, en condiciones normales, los primeros colonizadores son microorganismos aerobios (*Staphylococcus*, *Streptococcus* y enterobacterias) que favorecen el dominio, poco tiempo después, de anaerobios estrictos (eubacterias y clostridios) (Mackie et al., 1999; Palmer et al., 2007; Park et al., 2005). Nuestros resultados sobre la caracterización de la microbiota intestinal infantil coinciden en señalar a *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y *Escherichia* como los géneros mayoritarios. Además, ratifican la marcada influencia del tipo de alimentación que recibe el recién nacido en su microbiota intestinal, tanto en términos cualitativos como cuantitativos.

Los principales grupos de bacterias comensales detectados en las muestras de leche obtenidas de las madres que participaban en el estudio (estafilococos, estreptococos y enterococos) coinciden con los obtenidos con anterioridad por otros investigadores (Heikkilä et al., 2003; Martín et al., 2003 y 2007a). Es muy significativo que *S. epidermidis* sólo se encuentre en un escaso número de muestras de heces de niños alimentados con preparados infantiles, pero que esté presente en la gran mayoría de las muestras correspondientes a los niños alimentados con leche materna, así como en todas las muestras de leche materna analizadas (Jiménez et al., 2008b). Igualmente, en las heces de niños alimentados con fórmula tampoco se encuentran estreptococos, pero sí en la leche materna y en las heces de los niños que toman leche materna, aunque en menor proporción que los estafilococos. Considerando globalmente los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta los de otros estudios, se concluye que el perfil bacteriano de las muestras de heces procedentes de niños amamantados se puede considerar un reflejo del presente en la leche materna.

Por otra parte, la comparación de los perfiles genéticos de *S. epidermidis* aislados de leche materna y de las heces de los respectivos hijos ha permitido demostrar en un gran número de parejas madre-hijo que la misma cepa se encuentra tanto en la leche materna como en las heces de su hijo. Esto confirma el papel fundamental que tiene la leche materna en la transmisión vertical madre-hijo de bacterias comensales (Ahrné et al. 2005; Martín et al., 2003 y 2006; Matsumiya et al., 2002; Pérez et al., 2007).

La presencia de estafilococos en heces de niños amamantados está documentada desde hace más de 20 años (Sakata et al., 1985; Lundquist et al., 1985; Balmer y Wharton, 1989). Estudios más recientes también confirman que los estafilococos coagulasa-negativos forman parte de la microbiota intestinal de los niños occidentales alimentados con leche materna desde el tercer día posterior a su nacimiento, independientemente de que éste tuviera lugar por parto o cesárea (Adlerberth et al., 2006). Algunos autores mantienen que la colonización del intestino infantil por estafilococos ha aumentado progresivamente desde los años 70 hasta la actualidad como consecuencia de un estilo de vida más higiénico, que retrasa la adquisición de bacterias fecales “tradicionales” como las enterobacterias. Los estafilococos se convierten entonces en los primeros colonizadores del intestino aunque, después, la población decrece significativamente a partir del primer mes (Adlerberth et al., 2006; Borderon et al., 1996). Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que en aquellas muestras de heces de los recién nacidos alimentados con leche materna en las que se aisló *S. epidermidis*, su recuento decrecía de la semana 1 a la 5 (Jiménez et al., 2008b).

## **IX.9. CARACTERÍSTICAS DE LAS PRINCIPALES BACTERIAS COMENSALES DE LAS HECES DE LOS RECIÉN NACIDOS**

Uno de los microorganismos más significativos de la microbiota intestinal infantil es *S. epidermidis*, que se puede considerar un rasgo diferencial de los niños que reciben lactancia materna frente a los alimentados con fórmula. Esta especie, perteneciente al grupo de los estafilococos coagulasa-negativos, generalmente se

considera como una bacteria comensal y está presente de forma habitual en la piel y las mucosas. Pero, en ocasiones, es causa de infección, generalmente hospitalaria y asociada a la presencia de cuerpos extraños. Entre los factores de virulencia más destacables de las cepas de *S. epidermidis*, en relación con su patogenicidad y como ya se ha comentado anteriormente, se encuentra la capacidad de adhesión y de formar *biofilms*, gracias a la secreción de polisacárido y proteínas. También contribuye a su patogenicidad la resistencia a antibióticos que, además, en ocasiones es fácilmente transmisible a otras bacterias porque los genes responsables se encuentran en plásmidos (Archer y Climo, 2005). Sin embargo, no existe ninguna prueba sencilla que discrimine claramente las cepas con importancia clínica de las comensales, aunque algunas técnicas de genotipado han tenido resultados prometedores en el caso de cepas de *S. epidermidis* causantes de oftalmatitis (Duggirala et al., 2007; Rohde et al., 2004). Globalmente, la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* caracterizadas en este estudio eran portadoras de varios factores de adhesión pero no de resistencia a antibióticos o factores de virulencia como, por ejemplo, actividad hemolítica o potencial para producir *biofilms*.

La administración de leche materna a niños prematuros se ha asociado en numerosas ocasiones con una menor frecuencia de infecciones (Furman et al., 2003; Gartner et al., 2005; Hylander et al., 1998; Schanler et al., 1999). Resulta ilustrativo que, siendo *S. epidermidis* uno de los microorganismos más problemáticos en las UCIs neonatales, la administración de leche materna (en la que *S. epidermidis* es precisamente la bacteria predominante) conduzca a una notable reducción de la tasa de infecciones en prematuros. La presencia de *S. epidermidis* como especie bacteriana predominante en calostro y leche materna de mujeres sanas ofrece una posible explicación. Estas cepas comensales de estafilococos, proporcionadas primero por el calostro y después por la leche materna, podrían competir con éxito con las cepas hospitalarias (potencialmente patógenas y resistentes a antibióticos). Por ello, aunque hasta el momento no se ha considerado la posibilidad de emplear cepas de *S. epidermidis* procedentes de la leche materna (mutualistas) como probióticos en las unidades neonatales, esa idea no debería descartarse por completo. Es decir, asistiríamos a una demostración del concepto probiótico en su más estricto sentido científico. Sería necesario, por supuesto, realizar más estudios para confirmar la

seguridad de estas cepas, entre los que habría que incluir el análisis y la secuenciación completa de su genoma.

Entre los aislados obtenidos de heces de niños alimentados con fórmulas lácteas infantiles, *E. faecalis* fue la especie predominante, confirmando lo observado en otros estudios en los que ya a los seis días se detectaba la presencia en las heces de *E. faecalis* pero no de *S. epidermidis* (Jiménez et al., 2008b; Park et al., 2005). La especie *E. faecalis* también es controvertida por su doble faceta como comensal del TGI y como uno de los principales agentes implicados en infecciones nosocomiales (Kayser, 2003), de forma similar a lo comentado para *S. epidermidis*.

La incidencia en el género *Enterococcus* de factores de virulencia y/o de otros rasgos clínicamente significativos, como el patrón de resistencia a antibióticos o el potencial de transferencia de genes, parece ser específico de cada cepa (Eaton y Gasson, 2001; Franz et al., 2001; Temmerman et al., 2003). Vancanneyt et al. (2002) compararon los genotipos de cepas de *E. faecium* aisladas de muestras humanas, de animales y de alimentos. Los resultados obtenidos pusieron en evidencia que todos los aislados de origen humano relacionados con infecciones formaban un subgrupo bien definido, indicando una base genética común. Otros autores también han sugerido la existencia de subpoblaciones virulentas de *E. faecalis* (Pillai et al., 2002). Por lo tanto, es muy importante evaluar individualmente la seguridad de cada cepa.

Las cepas de *E. faecalis* aisladas de heces de niños mostraron mucha variabilidad en cuanto a las propiedades y los genes estudiados (Jiménez et al., 2008b). Sin embargo, prácticamente la mayoría poseían los genes relacionados con las feromonas sexuales (*ccf*, *cpd*, *cad*, *cob*) que facilitan el intercambio genético mediante la transferencia de plásmidos (Clewell, 1993) y de adhesinas de pared celular (*efaA*). Casi todos los aislados poseían el gen *gelE*. La gelatinasa (GelE) es una metaloendopeptidasa extracelular con capacidad para degradar diversos sustratos, como la gelatina, fragmentos insolubles de colágeno, la cadena  $\beta$  de la insulina, la hemoglobina o la endotelina-1. También se constató la presencia del gen *cylA* en 7 de los 24 *E. faecalis* aislados, pero sólo 2 mostraron capacidad de hemólisis. La proteína CylA es responsable de la modificación postraduccional de la citolisina, un lantibiótico

con actividad lítica frente a bacterias, eritrocitos y otras células eucariotas (Gilmore et al., 1994). Pese a que se encontraron distintos perfiles en cuanto a la posesión de genes relacionados con factores de virulencia, ninguno de los enterococos aislados pudo asociarse con ningún signo de infección. Es probable que el estado del hospedador sea un factor clave en el comportamiento de las bacterias, como patógenas o comensales, ya que en el estudio sólo participaron niños sanos nacidos a término. En contraposición, no se encontró ninguno de estos factores de virulencia en las 4 cepas de *E. faecium* aisladas del mismo tipo de muestras.

Con respecto a la resistencia a antibióticos, uno de los más relevantes es la vancomicina, ya que es el último recurso para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por patógenos multiresistentes (Franz et al., 2003). Los enterococos aislados de heces de recién nacido fueron sensibles a este antibiótico (Jiménez et al., 2008b), como se ha constatado con otros aislados no relacionados con infecciones (Kayser, 2003; Franz et al., 2001). Sin embargo, los enterococos preocupan no sólo por su capacidad de resistir a muchos antimicrobianos utilizados en medicina humana, sino también por su capacidad para adquirir y transferir resistencias (Mundy et al., 2000).

Por último, cabe destacar que, a pesar de lo descrito por otros autores, el género *Bifidobacterium* no fue el mayoritario en las heces de los niños amamantados (Benno et al., 1984; Penders et al., 2006; Stark y Lee, 1982), aunque efectivamente sí se aisló un mayor número que en las heces de los niños alimentados con fórmulas infantiles. Precisamente, uno de los rasgos más característicos de la leche humana es su elevado contenido en oligosacáridos (Coppa et al., 1993), cuya función como prebióticos potenciando el crecimiento de las bifidobacterias es bien conocida (German et al., 2008). Sin embargo, no es la primera vez que las bifidobacterias no se encuentran en las heces de niños ni en la abundancia ni con la frecuencia esperada o que no se observan diferencias en función con el tipo de alimentación (Palmer et al., 2007; Penders et al., 2005). Entre las posibles explicaciones sugeridas están la sospecha de que este género haya recibido una atención desproporcionada (Palmer et al., 2007), la dificultad para su cultivo *in vitro* o que las modificaciones introducidas en las leches

de fórmula han logrado un producto más parecido a la leche materna (Penders et al., 2005).

#### **IX.10. LAS MASTITIS: UNA CAUSA EVITABLE DE DESTETE PRECOZ**

En los últimos años, la lactancia materna está siendo objeto de un renovado interés en los países desarrollados debido a los beneficios que este tipo de alimentación proporciona a la pareja madre-hijo a corto, medio y largo plazo (Schack-Nielsen et al., 2005; Schack-Nielsen y Michaelsen, 2006). De hecho, en plena era de la Nutrigenómica, la leche humana se ha convertido en una inagotable fuente de sorpresas. Actualmente se sabe que ciertos componentes de la leche materna ejercen efectos beneficiosos a largo plazo pero únicamente cuando el individuo tiene contacto con ellos durante los primeros meses de vida (Picó et al., 2007). Por otra parte, todavía desconocemos la función de gran parte de los más de 100 compuestos bioactivos que contiene la leche humana y que no están representados en las fórmulas infantiles. En este sentido, la OMS (2001) recomienda la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses y que, llegada esta edad, el destete se realice de forma gradual, de tal manera que la lactancia se mantenga durante un tiempo no inferior a los dos años. Estas recomendaciones son difíciles de cumplir en nuestro entorno debido a los condicionantes laborales y/o a la falta de información y apoyo (Li et al., 2008).

Desde el punto de vista médico, las mastitis constituyen la principal causa de destete precoz; sin embargo, resulta sorprendente la gran escasez de estudios microbiológicos sobre mastitis humanas a pesar de que en la mayoría de los casos tienen una etiología infecciosa. A este respecto, Foxman et al. (2002) publicaron uno de los estudios más amplios sobre mastitis infecciosas durante la lactancia realizados hasta la fecha y, aunque revisaron hasta el más remoto factor predisponente, no investigaron los agentes etiológicos implicados en cada caso. Estos mismos autores reconocían esa importante laguna en el conocimiento de las mastitis humanas, ya que existen pocos estudios al respecto y, los que hay, suelen estar anticuados. Por ello, reclamaron la atención del mundo científico hacia este tema debido a su fuerte impacto sanitario y social. Ante la ausencia de un diagnóstico etiológico y la frecuente



prescripción de un tratamiento inadecuado, las mujeres con este problema suelen enfrentarse a un difícil dilema: (1) seguir amamantando a su hijo aguantando el dolor y el resto de síntomas lo mejor posible y, en muchos casos, ante la incompreensión de su propio pediatra, o (2) abandonar la lactancia. Esta situación contrasta con la existente en medicina veterinaria, donde el conocimiento sobre la etiología, prevención y manejo de las mastitis es muy amplio dado que implica un problema económico de primera magnitud en los sistemas de producción láctea.

Parece evidente, pues, que se necesitan investigaciones sobre las mastitis infecciosas, en las que se correlacionen parámetros tan diversos como el aislamiento y recuento de las bacterias implicadas, el recuento de células somáticas, parámetros bioquímicos, inmunológicos y datos microbiológicos complementarios, que confirmen la pérdida de la diversidad bacteriana y la proliferación selectiva de una o más cepas. El establecimiento de un criterio objetivo para el diagnóstico de mastitis infecciosas y el conocimiento de las principales características de los agentes implicados representaría todo un avance que permitiría el diseño de nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de estos problemas y contribuiría a que muchas parejas madre-niño disfruten plenamente de los beneficios de la lactancia materna.

Como se ha comentado anteriormente, entre las bacterias que se encuentran de forma fisiológica en la leche humana destacan los estafilococos y los estreptococos. El hecho de que ciertos grupos bacterianos que se encuentran de forma natural en la leche puedan ocasionalmente estar implicados en la etiología de las mastitis infecciosas ha llevado a plantear una hipotética imposibilidad a la hora de interpretar los resultados de los análisis microbiológicos (Kvist et al., 2008). Sin embargo, eso sería como admitir que no se puede saber cuando hay un problema de hipercolesterolemia porque el colesterol es una sustancia que ya se encuentra de forma fisiológica en la sangre. En realidad, y disponiendo de los medios adecuados, el diagnóstico etiológico de las mastitis suele ser relativamente sencillo en la mayoría de los casos ya que se produce una auténtica disbiosis de la microbiota normal de la glándula mamaria, con un espectacular aumento de la concentración del agente causal, muy por encima de los límites normales, y la desaparición del resto de las bacterias “fisiológicas” de la leche (lactobacilos, lactococos, enterococos, bifidobacterias...) (Delgado et al., 2008). A

modo de referencia, la concentración bacteriana total en la leche fresca de una mujer sin mastitis suele ser inferior a 2000 bacterias/ml. *S. epidermidis* suele encontrarse en la leche de prácticamente todas las mujeres pero su concentración máxima no debería ser superior a 600-800/ml. *S. aureus* se encuentra en un porcentaje minoritario de mujeres asintomáticas (<20%) y, en tales casos, su concentración suele ser inferior a 300-400/ml. Los estreptococos se hallan ampliamente distribuidos (especialmente las especies *St. mitis*, *St. salivarius*, *St. sanguinis* y *Streptococcus oralis*) con una concentración habitualmente inferior a 500/ml.

*S. aureus* se ha considerado tradicionalmente como la especie causante de mastitis por excelencia en prácticamente todas las especies de mamíferos. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que realmente los estafilococos coagula-negativos (con *S. epidermidis* a la cabeza) representan la primera causa de mastitis bovinas, superando en incidencia a *S. aureus* (dos Santos Nascimento et al., 2005; Thorberg et al., 2006; Vankerckhoven et al., 2004). Lo mismo parece suceder en las mastitis humanas ya que un reciente análisis molecular de la microbiota presente en leche materna de mujeres con mastitis reveló que *S. epidermidis* era el principal agente implicado, muy por encima de *S. aureus* (Delgado et al., 2008). También en nuestro laboratorio se han comparado las propiedades de cepas de *S. epidermidis* de leche de mujeres sanas con las de aquellas procedentes de leche de mujeres con mastitis (Delgado et al., 2009). Los resultados muestran que prácticamente todas las cepas relacionadas con casos de mastitis poseen el gen *icaD* y una resistencia notablemente mayor frente a diversos antibióticos. Previamente se ha descrito que la inoculación de cepas de *S. epidermidis* aisladas de mastitis humanas en las glándulas mamarias de ratonas conduce a la aparición de signos histológicos y clínicos de mastitis (Thomsen et al., 1985).

En definitiva, los estafilococos coagulasa-negativos son agentes etiológicos de mastitis lactacionales y su presencia en las muestras de leche de mujeres con mastitis no debe considerarse como una mera contaminación. En esta Tesis se realizó un ensayo clínico con probióticos en el que participaron 20 mujeres con mastitis lactacional. En el 60% de los casos el agente etiológico fue *S. epidermidis* mientras que en el 40% restante fue *S. aureus*. Dado que, por una parte, las mujeres que

participaron presentaban fiebre o febrícula (un síntoma más asociado a las mastitis por *S. aureus*) y que, por otra, la mayoría de las mastitis no provocan aumento de la temperatura, es más que probable que el protagonismo de *S. epidermidis* como agente etiológico de estas infecciones sea mucho mayor.

## **IX.11. TRATAMIENTO DE LAS MASTITIS CON PROBIÓTICOS**

Ante una mastitis infecciosa las reacciones más generalizadas son: (1) desaconsejar la lactancia ante el temor injustificado de que el agente causal pueda perjudicar al niño y/o ante el desconocimiento de los antibióticos que se pueden emplear; o (2) utilizar, por defecto, un antibiótico beta-lactámico (mayoritariamente, mupirocina por vía tópica, y cloxacilina, amoxicilina o amoxicilina/clavulánico por vía oral) o un antifúngico (nistatina, fluconazol) sin análisis microbiológico previo.

Con relación a la aplicación inadecuada de antifúngicos, todavía muchas matronas, pediatras, ginecólogos y miembros de asociaciones de lactancia creen, injustificadamente, que *C. albicans* es una de las principales causas de mastitis o de dolor en los pezones. De hecho, gran parte de las muestras sospechosas de mastitis que recibimos en nuestro laboratorio proceden de mujeres a las que se les ha administrado antifúngicos por vía oral y/o tópica durante un tiempo prolongado sin ninguna mejoría o con un empeoramiento del cuadro clínico. Resulta sorprendente que el diagnóstico de candidiasis “mamaria” se había hecho, en todos los casos, sobre la base exclusiva de la inspección visual del pecho; en algunos de ellos, se había diagnosticado observando un pecho/pezón dolorido pero con un aspecto externo normal y sin tener en cuenta, en ningún momento, los famosos postulados de Koch. La revisión bibliográfica de los casos de mastitis atribuidos a *Candida* spp. demuestra la falta de evidencias para llegar a tal diagnóstico (Carmichael y Dixon, 2002). *C. albicans* es el agente causal de la candidiasis oral (*muguet*) en niños y de la candidiasis vaginal en mujeres. Además, puede causar infecciones graves en niños prematuros, en personas inmunodeprimidas o diabéticas. Sin embargo, y a diferencia de lo que sucede con estafilococos y estreptococos, la glándula mamaria no es un ecosistema adecuado para su crecimiento.

Se debe destacar que, entre el amplio listado de muestras biológicas sobre las que se puede efectuar un análisis microbiológico en los hospitales no figura, de momento, la leche humana. No debe extrañar que un elevado porcentaje de mastitis tratadas con antibióticos deriven en una infección crónica o recurrente, ya que son causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos que se suelen prescribir por defecto (beta-lactámicos). Estas resistencias ya se han descrito para cepas de estafilococos asociadas con mastitis bovina (Martineau et al., 2000; Rich et al., 2005; Luthje y Schward, 2006). El desconocimiento de los medicamentos compatibles con la lactancia por parte de algunos profesionales (médicos de familia, pediatras, ginecólogos, matronas...) supone un obstáculo adicional para el correcto tratamiento de las mastitis. Por ejemplo, está muy extendida la creencia de que ciertos antimicrobianos eficaces en estos casos, como el sulfametoxazol/trimetoprim o el ciprofloxacino, son incompatibles con la lactancia. Realmente, son pocos los principios activos realmente incompatibles con la lactancia (<http://www.e-lactancia.org>).

En los últimos años, los problemas asociados a la difusión de bacterias resistentes a antibióticos de relevancia clínica han conducido a un renovado interés por la bacterioterapia, una práctica que hace uso de bacterias probióticas para prevenir o tratar la colonización del hospedador por parte de patógenas (Huovinen, 2001; Rodríguez y Dalmau, 2006a, 2006b). Existen datos muy prometedores sobre el empleo de probióticos como una alternativa atractiva y eficaz para el tratamiento de las mastitis bovinas (Klostermann et al., 2008; Crispie et al., 2008). Como se ha señalado repetidamente a lo largo de esta Tesis, la leche materna es una fuente idónea de bacterias probióticas (Martín et al., 2003, 2004, 2005, 2006), con potencial para diseñar nuevas estrategias alternativas y/o complementarias a la antibioterapia frente a las mastitis infecciosas. Además, las bacteriocinas (péptidos antimicrobianos producidos por bacterias) también podrían ser muy útiles para combatir las mastitis infecciosas. A diferencia de muchos antibióticos, algunas bacteriocinas (nisina, lactacina 3147 o uberolisina) son activas frente a la mayoría de las especies productoras de mastitis, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*, *St. agalactiae* o *St. uberis* (Broadbent et al., 1989; Sears et al., 1992; Ryan et al., 1998; Wirawan et al., 2007). El hecho de que la presencia de cepas de *Lactococcus lactis* productoras de

nisina sea relativamente común en la leche de mujeres sanas resulta ilustrativo (Beasley y Saris, 2004). De hecho, la aplicación de esta bacteriocina ha resultado ser muy eficaz en casos de mastitis estafilocócicas humanas refractarias a la antibioterapia (Fernández et al., 2008). Es posible que, en un futuro no muy lejano, dado el distinto modo de acción de antibióticos y bacteriocinas, éstas puedan suplir o complementar a los antibióticos en el tratamiento de las mastitis.

La disponibilidad de cepas de lactobacilos procedentes de la leche humana con potencial probiótico (Martín et al., 2005 y 2006), incluyendo una elevada resistencia durante su tránsito por el aparato digestivo y una notable actividad frente a los principales agentes causantes de mastitis, nos llevó a plantear su aplicación por vía oral para el tratamiento de mastitis lactacionales. Previamente, Heikkilä y Saris (2003) habían sugerido que las bacterias lácticas aisladas de leche humana tienen un gran potencial como agentes bacterioterapéuticos en el tratamiento y/o prevención de las infecciones de mama causadas por *S. aureus*.

Más concretamente, se aplicaron dos cepas (*Lactobacillus salivarius* CECT 5713 y *Lb. gasseri* CECT 5714) diariamente durante 4 semanas en mujeres con mastitis estafilocócica (Jiménez et al., 2008c). Su administración por vía oral condujo a reducciones de aproximadamente 1,5-2 ciclos logarítmicos de los recuentos de estafilococos en la leche y a una desaparición de la sintomatología clínica asociada a la infección inicial. Los recuentos finales de estafilococos fueron de 2 a 3 log<sub>10</sub> ufc/ml, un número considerado como normal y aceptable en la leche de mujeres sanas (Kvist et al., 2008; Heikkilä y Saris, 2003; OMS, 2000). En las mujeres del grupo placebo, el recuento final de estafilococos fue prácticamente idéntico al inicial y no se había producido ninguna mejora en la sintomatología.

Tanto *Lb. salivarius* CECT 5713 y *Lb. gasseri* CECT 5714 fueron transferidos del intestino de las madres a la glándula mamaria en el grupo “probiótico”, lo que demuestra la participación de estas bacterias en la ruta entero-mamaria, tal y como se había postulado anteriormente (Martín et al., 2004). No es de extrañar el hecho de que tras el tratamiento probiótico, *Lb. salivarius* CECT 5713 y *Lb. gasseri* CECT 5714 fueran precisamente los únicos lactobacilos detectados en la leche ya que no se habían

detectado lactobacilos en las muestras de leche de las mujeres antes de iniciar el tratamiento. Además, tanto las heces de los niños lactantes como la leche materna suelen incluir un bajo número de especies de lactobacilos (Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003 y 2007a,b); en este mismo sentido, el análisis de la colonización intestinal por lactobacilos en 112 niños amamantados mostró que durante los 6 primeros meses de vida, el 26% de ellos no tenían lactobacilos, el 37% tenía sólo una cepa, el 26% dos cepas y sólo el 11% tenía tres o más cepas (Ahrné et al., 2005).

*Lb. salivarius* CECT 5713 fue la cepa predominante en la leche tras el tratamiento probiótico (Jiménez et al., 2008c). Estudios con otras cepas de *Lb. salivarius* en modelos animales y ensayos clínicos han demostrado su acción antiinfecciosa y antiinflamatoria en diversas situaciones (Dunne et al., 2001; McCarthy et al., 2003; Ryan et al., 2008; Sheil et al., 2004). La combinación de las posibles propiedades antiinfecciosas y antiinflamatorias de *Lb. salivarius* CECT 5713 puede explicar la eficacia mostrada en el ensayo clínico. En resumen, los resultados obtenidos indican que *Lb. salivarius* CECT 5713 y *Lb. gasseri* CECT 5714 representan una alternativa muy atractiva para el tratamiento de mastitis infecciosas durante la lactancia.

## **X. CONCLUSIONES**





**PRIMERA.** En esta Tesis se aislaron bacterias de la sangre del cordón umbilical y de meconio de niños sanos, lo que sugirió que los fetos a término no son microbiológicamente estériles y que podría existir una transferencia de bacterias entre la madre y el feto. El hecho de que la administración oral de una cepa de *Enterococcus faecium* marcada genéticamente a ratonas gestantes condujera a su presencia en muestras de líquido amniótico y meconio obtenidas mediante cesárea confirma la existencia de dicha transferencia.

**FIRST.** In this PhD Thesis, bacteria could be isolated from umbilical cord's blood and meconium of healthy neonates, which suggested that term foetuses are not completely sterile and that a mother-to-foetus efflux of commensal bacteria may exist. The fact that oral administration of a genetically-labelled *Enterococcus faecium* strain to pregnant mice led to its presence in samples of amniotic fluid and meconium obtained by Caesarean section confirmed the existence of such bacterial transfer.

**SEGUNDA.** El análisis bacteriológico de muestras de calostro de mujeres sanas reveló que *S. epidermidis* y *E. faecalis* eran las especies dominantes, seguidas de *St. mitis*, *P. acnes* y *S. lugdunensis*. Los genes *ica* (implicado en la formación de *biofilms*) y *mecA* (que confiere resistencia a la meticilina) únicamente fueron detectados en un porcentaje muy bajo de las cepas de *S. epidermidis* mientras que todos los enterococos aislados carecían de los genes *cylA*, *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG*. Globalmente, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que el calostro es una fuente de bacterias seguras para el intestino neonatal.

**SECOND.** Bacteriological analysis of colostrum provided by healthy women revealed that *S. epidermidis* and *E. faecalis* were the dominant species, followed by *St. mitis*, *P. acnes* and *Staphylococcus lugdunensis*. Among the 48 isolates selected on the basis of their genetic profiles, the biofilm-related *ica* gene and the *mecA* gene were only detected in a small percentage of the *S. epidermidis* strains while all the enterococcal isolates were devoid of the *cylA*, *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* and *vanG* genes. Globally, there were no indications that the colostrum samples contained harmful bacteria.

**TERCERA.** *S. epidermidis* fue la especie predominante en la leche de 17 mujeres y en las heces de sus respectivos hijos, alimentados mediante lactancia materna exclusiva. En contraste, su prevalencia fue prácticamente insignificante en heces de niños alimentados con una fórmula infantil. *E. faecalis* fue la segunda especie dominante en las muestras de heces de los niños amamantados pero, en este caso, también estaba presente en todas las de los niños alimentados con fórmula. En consecuencia, la presencia de *S. epidermidis* parece ser un rasgo diferencial de la microbiota intestinal de niños amamantados. El análisis de los posibles factores de virulencia y de la resistencia a antibióticos entre los estafilococos y enterococos aislados confirmó que la leche es una fuente de bacterias seguras para el intestino infantil.

**THIRD.** *S. epidermidis* was the dominant species in milk of 17 women and in faeces of their respective breast-fed infants. In contrast, its prevalence was notably lower in faeces of formula fed-infants. *E. faecalis* was the second predominant bacterial species among the faecal samples provided by the breast-fed infants but it was also present in all the samples from the formula-fed ones. The presence of *S. epidermidis* seems to be a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. Analysis of potential virulence determinants and resistance to antibiotics among the staphylococcal and enterococcal isolates confirmed that milk is a source of safe bacteria to the infant gut.

**CUARTA.** En esta Tesis se investigó la presencia de bifidobacterias en leche humana y su posible transferencia al intestino infantil. Veintitrés mujeres y sus correspondientes hijos proporcionaron muestras de leche y heces, respectivamente, en el día 4-7 posparto. Se aislaron bifidobacterias en 8 muestras de leche y en 21 muestras de heces. Las especies presentes en leche fueron *B. breve*, *B. adolescentis* y *B. bifidum* mientras que en las heces también se aislaron *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*. El análisis mediante PCR-DGGE reveló la presencia de entre 1 y 4 bandas dominantes de DNA bifidobacteriano en 22 muestras de leche, pertenecientes a las especies *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum* o *B. dentium*. La técnica de qRTi-PCR permitió la detección de DNA bifidobacteriano en las 22 muestras, en un rango de entre 40 y 10.000 copias del gen 16S rDNA/ml. En consecuencia, la leche materna es una fuente de bifidobacterias para el intestino infantil.

**FOURTH.** In this PhD Thesis, we investigated the presence of bifidobacteria in human milk and their potential transfer to the infant gut. Twenty-three women and their respective infants provided samples of breast milk and feces, respectively, at day 4-7 after birth. Bifidobacteria were present in 8 milk samples and 21 fecal samples. *B. breve*, *B. adolescentis* and *B. bifidum* were isolated from milk while infant feces also contained *B. longum* and *B. pseudocatenulatum*. PCR-DGGE analysis revealed the presence of between 1 to 4 bifidobacterial DNA dominant bands in 22 milk samples, which were identified as *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum* and *B. dentium*. Bifidobacterial DNA could be detected by qRTi-PCR in these 22 milk samples in a range between 40 and 10,000 16S rRNA gene copies per ml. In conclusion, human milk is a source of bifidobacteria to the infant gut.

**QUINTA.** El último objetivo de esta Tesis fue la aplicación de dos cepas de lactobacilos aislados de leche humana para el tratamiento de las mastitis lactacionales. En el ensayo participaron 20 mujeres lactantes a las que se les había diagnosticado una mastitis estafilocócica. El grupo “probiótico” recibió una cápsula diaria con *Lb. gasseri* CECT 5714 y *Lb. salivarius* CECT 5713 durante 4 semanas. El otro grupo recibió una cápsula que únicamente contenía el excipiente. La mejoría de las mujeres del grupo “probiótico” fue progresiva a lo largo del tratamiento y se reflejó en una disminución significativa del recuento de estafilococos, un aumento del de lactobacilos y la desaparición de la sintomatología. Las dos cepas administradas se pudieron detectar en la leche, lo que confirma la existencia de transferencia bacteriana entre el aparato digestivo y la glándula mamaria de las mujeres lactantes. Las mujeres del grupo control no experimentaron ninguna mejoría. En consecuencia, la aplicación de estas cepas constituye una alternativa para el tratamiento de las mastitis lactacionales.

**FIFTH.** The last objective of this PhD Thesis was the application of two lactobacilli strains isolated from breast milk to treat lactational mastitis. In the assay, 20 women with staphylococcal mastitis were randomly divided in two groups. Those in the probiotic group daily ingested a capsule containing *Lb. salivarius* CECT 5713 and *Lb. gasseri* CECT 5714 for 4 weeks while those in the control one only ingested the excipient. Those women assigned to the probiotic group experienced a progressive improvement throughout the assay, including a significant decrease in the staphylococcal count, an increase in the lactobacilli count and the relief of the symptoms. Both lactobacilli strains could be isolated from milk, confirming the existence of a bacterial transfer between the gut and the mammary gland during lactation. In contrast, women of the placebo group did not experience any improvement at the end of the assay. Therefore, *Lb. salivarius* CECT 5713 and *Lb. gasseri* CECT 5714 appear to be an efficient alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation.

## **XI. BIBLIOGRAFÍA**



- AAP (American Academy of Pediatrics)**. 1988. Committee on Nutrition. Clinical testing of infant formulas with respect to nutritional suitability for term infants. Elk Grove Village, IL, USA. En: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-clin.html>
- Abreu, M.T.**, Fukata, M., Arditi, M. 2005. TLR signalling in the gut in health and disease. *J. Immunol.* 174: 4453-4460.
- Adam, B.**, Baillie, G.S., Douglas, L.J. 2002. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 51: 344-349.
- Adlerberth, I.**, Carlsson, B., deMan, P., Jalil, F., Khan, S.R., Larsson, P., Mellander, L., Svanborg, C., Wold, A.K., Hanson, L.A. 1991. Intestinal colonization with *Enterobacteriaceae* in Pakistan and Swedish hospital delivered infants. *Acta Paediatr. Scan.* 80: 602-610.
- Adlerberth, I.**, Lindberg, E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I.L., Wold, A.E. 2006. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle. *Pediatr. Res.* 59: 96-101.
- Agostoni, C.**, Axelsson, I., Goulet, O., Koletzko, B., Michaelsen, K.F., Puntis, J.W.L., Rigo, J., Shamir, R., Szajewska, H., Turck, D. ESPGHAN Committee on Nutrition. 2004. Prebiotic oligosaccharides in dietetic products for infants: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Paediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39 (5): 465-473.
- Aguayo, J.** 2001. Maternal lactation for preterm newborn infants. *Early Hum. Dev.* 65 Suppl: S19-S29.
- Ahn, Y.J.**, Park, S.K., Oh, J.W., Sun, H.Y., Shin, S.H. 2004. Bacterial growth in amniotic fluid is dependent on the iron-availability and the activity of bacterial iron-uptake system. *J. Korean Med. Sci.* 19: 333-340.
- Ahrné, S.**, Lönnemark, E., Wold, A.E., Åberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I.L., Molin, G., Adlerberth, I. 2005. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microb. Infect.* 7: 1256-1262.
- Alouf, J.E.**, Müller-Alouf, H. 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 429-440.
- Altenhoefer, A.**, Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J., Oelschlaeger, T.A. 2004. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40 (3): 223-229.
- Amir, L.H.**, Forster, D., McLachlan, H., Lumley, J. 2004. Incidence of breast abscess in lactating women: report from an Australian cohort. *BJOG.* 111: 1378-1381.
- Anderson, J.E.**, Held, N., Wright, K. 2004. Raynaud's phenomenon of the nipple: a treatable cause of painful breastfeeding. *Pediatrics.* 113: e360-e364.

- Anderson, S.M.,** Rudolph, M.C., McManaman, J.L., Neville, M.C. 2007. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Res.* 9 (1): 204.
- Anthony, B.,** Okada, D., Hobel, C. 1978. Epidemiology of group B streptococcus: longitudinal observations during pregnancy. *J. Infect. Dis.* 137: 524-530.
- Aplin, J.D.,** Kimber, S.J. 2004. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 48.
- Archer, G. L.,** Climo, M.W. 2005. *Staphylococcus epidermidis* y otros estafilococos coagulasa-negativos. Cap. 193. En: *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. Vol. 2. 6ª ed. Mandell, G.L., Douglas, J.E. y Dolin R. (eds). Elsevier, España.
- Are, A.,** Aronsson, L., Wang, S., Greicius, G., Lee, Y.K., Gustafsson, J.A., Pettersson, S., Arulampalam, V. 2008. *Enterococcus faecalis* from newborn babies regulate endogenous PPARgamma activity and IL-10 levels in colonic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 1943-1948.
- Artis, D.** 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.* 8 (6): 411-420.
- Arvola, T.,** Laiho, K., Torkkeli, S., Mykkänen, H., Salminen, S., Maunula, L., Isolauri, E. 1999. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics.* 104 (5): e64.
- Arvola, T.,** Moilanen, E., Vuento, R., Isolauri, E. 2002. Gut barrier during weaning in atopic infants (abstract). *ESPGHAN.* 457.
- Arvola, T.,** Ruuska, T., Keränen, J., Hyöty, H., Salminen, S., Isolauri, E. 2006. Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. *Pediatrics.* 117 (4): e760-768.
- Bäckhed, F.,** Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 307: 1915-1920.
- Baker, C.,** Edwards, M. 1995. Group B streptococcal infections. En: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Remington, J., Klein, J., (eds.) WB Saunders, Filadelfia.
- Bakhshandeh-Nosrat, S.,** Ghazisaidi, K., Ghaemi, E.O., Fatemi-Nasab, F., Mohamadi, M. 2007. The etiological agents of mastitis in lactating women in Iran. *Middle East J. Fam. Med.* 5: 21-22.
- Balmer, S.E .,** Wharton, B.A. 1989. Diet and fecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch. Dis. Child.* 64: 1672-1677.
- Baron, T.H.,** Ramirez, B., Richter, J.E. 1993. Gastrointestinal motility disorders during pregnancy. *Ann. Intern. Med.* 118 (5): 366-375.
- Barrons, R.,** Tassone, D. 2008. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial



- genitourinary infections in women: a review. *Clin. Ther.* 30 (3): 453-468.
- Bearfield, C.,** Davenport, E.S., Sivapathasundaram, V., Allaker, R.P. 2002. Possible association between amniotic fluid microorganism infection and microflora in the mouth. *BJOG.* 109: 527-533.
- Beasley, S.S.,** Saris, P.E.J. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5051-5053.
- Beaugerie, L.,** Petit, J.C. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18 (2): 337-352.
- Becker, M. R.,** Paster B.J., Leys, E.J., Moeschberger, M.L., Kenyon, S.G., Galvin, J.L., Boches, S.K., Dewhirst, F.E., Griffen, A.L. 2002. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1001-1009.
- Bellomo, G.,** Mangiagle, A., Nicastro L., Frigerio, G. 1980. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Curr. Ther. Res.* 28: 927-934.
- Bengmark, S.,** Jeppsson, B. 1995. Gastrointestinal surface protection and mucosa reconditioning. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 19(5): 410-415.
- Benno, Y.,** Sawada, K., Mitsuoka, T. 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol.* 28: 975-986.
- Benno, Y.,** Suzuki, K., Narisawa, K., Bruce, W.R., Mitsuoka, T. 1986. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol. Immunol.* 30: 521-532.
- Berg, R.D.,** Garlington, A.W. 1979. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect. Immunol.* 23: 403-411.
- Berg, R.D.** 1995. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.* 3(4): 149-154.
- Berg, R.D.** 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4: 430-435.
- Bernet, M.F. ,** Brassart, D., Nesser, J.R., Servin, A.L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cells lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 35: 483-489.
- Bertotto, A.,** Gerli, R., Castellucci, G., Scalise, F., Vaccaro, R. 1991. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCS1-positive cells. *Immunology.* 74: 360-361.
- Bettelheim, K.A.,** Breardon, A., Faiers, M.C. y O'Farrell, S.M. 1974. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. *J. Hyg (Lond),* 72: 67-70.
- Bin-Nun, A. ,** Bromiker, R., Wilschanski, M., Kaplan, M., Rudensky, B., Caplan, M., Hammerman, C. 2005. Oral probiotics prevent necrotizing

enterocolitis in very low birth weight neonates. *J. Pediatr.* 147: 192–196.

**Bingen, E.,** Denamur, E., Lambert-Zechovsky, N., Aujard, Y., Brahimi, N., Geslin, P., Elion, J. 1992. Analysis of DNA restriction fragment length polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in *Streptococcus agalactiae* late-onset neonatal infection. *J. Infect. Dis.* 165: 569–573.

**Björkstén, B.,** Sepp, E., Julge, K., Voor, T., Mikelsaar, M. 2001 Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108 (4): 516–520.

**Blakey, J.L.,** Lubitz, L., Barnes, G.L., Bishop, R.F., Campbell, N.T., Gillam, G.L. 1982. Development of gut colonisation in pre-term neonates. *J. Med. Microbiol.* 15 (4): 519–29.

**Blum, S.,** Rochat, F., Schriffin, E. 2005. Prebióticos, probióticos e inmunidad. Disponible en: URL: <http://www.nestle.cl/revistansb/revistaNSBprebioticos.htm>.

**Bongaerts, G.P.,** Severijnen, R.S., Tangerman, A., Verrips, A., Tolboom, J.J. 2000. Bile acid deconjugation by Lactobacilli and its effects in patients with a short small bowel. *J. Gastroenterol.* 35 (11): 801–804.

**Bole-Feysot, C.,** Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19 (3): 225–268.

**BOE (Boletín Oficial del Estado).** 2002. Número 44, 20 de Febrero, pp. 6756–6799.

**BOE (Boletín Oficial del Estado).** 2008. Número 131, 30 de Mayo, pp. 25121–25125.

**Borderon, J.C.,** Lionnet, C., Rondeau, C., Suc, A.I., Laugier, J., Gold, F. 1996. Current aspects of fecal flora of the newborn without antibiotherapy during the first 7 days of life: enterobacteriaceae, enterococci, staphylococci. *Pathol. Biol.* 44: 416–422.

**Botella-Llusiá, J.** 2008. *Tratado de ginecología*. Ediciones Díaz de Santos. España.

**Bougle, D.,** Roland, N., Lebeurrier, F., Arhan, P. 1999. Effect of propionibacteria supplementation on fecal bifidobacteria and segmental colonic transit time in healthy human subjects. *Scand. J. Gastroenterol.* 34: 144–148.

**Boyle, R.J.,** Leonardi-Bee, J., Bath-Hextall, F.J., Tang, M.L. 2009. Probiotics for the treatment or prevention of eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (1): 266–267.

**Bradley, A.** 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164 (2): 116–128.

**Brandtzaeg, P.,** Halstensen, T.S., Kett, K., Krajci, P., Kvale, D., Rognum, T.O., Scott, H., Sollid, L.M. 1989. Immunobiology and immuno-pathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial

- lymphocytes. *Gastroenterology*. 97: 1562-1584.
- Broadbent, J.R.,** Chou, Y.C., Gillies, K., Kondo, J.K. 1989. Nisin inhibits several Gram positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* 72:3342-3345.
- Brook, I.,** Barret, C., Brinkman, C., Martin, W. y Finegold, S. 1979. Aerobic and anaerobic bacterial flora of the maternal cervix and newborn gastric fluid and conjutiva: a prospective study. *Pediatrics* 63: 451-455.
- Buescher, E .S.,** McIlheran, S.M. 1988. Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr. Res.* 24 (1): 14-19.
- Buduneli, N.,** Baylas, H., Buduneli, E., Türkoğlu, O., Köse, T. y Dahlen, G. 2005. Periodontal infections and preterm low birth weight: a case-control study. *J. Clin. Periodontol.* 32: 174-181.
- Burgess, C.,** O'Connell-Motherway, M., Sybesma, W., Hugenholtz, J., van Sinderen, D. 2004. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for *in situ* production of vitamin-enriched foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5769-5777.
- Burton, J.L.,** Erskine, R.J. 2003. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19 (1): 1-45.
- Burton, G.J.,** Watson, A.L., Hempstock, J., Skepper, J.N., Jauniaux, E. 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (6): 2954-2959.
- Butler, J.E.** 1979. Immunologic aspects of breast feeding, antiinfectious activity of breast milk. *Semin. Perinatol.* 3 (3): 255-270.
- Butler, J.E.,** Sun, J., Weber, P., Navarro, P., Francis, D. 2000. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets. III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology.* 100: 119-130.
- Buts, J.P.,** Corthier, G., Delmee, M. 1993. *Saccharomyces boulardii* for *Clostridium difficile*-associated enteropathies in infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 16(4):419-25.
- Buydens, P.,** Debeuckelaere, S. 1996. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scand. J. Gastroenterol.* 31 (9): 887-891.
- Cario, E.** 2005. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut.* 54: 1182-1193.
- Carlson, S.E.** 1985. *N*-Acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 41: 720-726.
- Carmichael, A.R.,** Dixon, J.M. 2002. Is lactation mastitis and shooting breast pain experienced by women during lactation caused by *Candida albicans*? *Breast.* 11: 88-90.
- Cattaneo, A.,** Davanzo, R., Uxa, F., Tamburlini, G. 1998. Recommendations for the implementation of Kangaroo

- Mother Care for low birthweight infants. *Acta Paediatr.* 87: 440-445.
- Caufield, P.W.,** Dasanayake, A.P., Li, Y., Pan, Y., Hsu, J., Hardin, J.M. 2000. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect. Immun.* 68: 4018–4023.
- Charpak, N.,** Ruiz-Peláez, J.G., Charpak, Y. 1994. Rey-Martinez Kangaroo Mother Program: An alternative way of caring for low birth weight infants? One year mortality in a two cohort study. *Pediatrics.* 94: 804-810.
- Cheikhyoussef, A.,** Pogori, N., Chen, W., Zhang, H. 2008. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application. *Int. J. Food Microbiol.* 125 (3):.215-222.
- Chu, Y.W.,** Tse, C., Tsang, G.K., So, D.K., Fung, J.T., Lo, J.Y. 2007. Invasive group B *Streptococcus* isolates showing reduced susceptibility to penicillin in Hong Kong. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 1407-1409.
- Clark, D.A.** 1977. Times of first void and first stool in 500 newborns. *Pediatrics.* 60 (4): 457-459.
- Clewell, D .B.** 1993. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell.* 73 (1): 9-12.
- Colbère-Garapin, F.,** Martin-Latil, S., Blondel, B., Mousson, L., Pelletier, I., Autret, A., François, A., Niborski, V., Grompone, G., Catonnet, G., van de Moer, A. 2007. Prevention and treatment of enteric viral infections: possible benefits of probiotic bacteria. *Microbes Infect.* 9 (14-15): 1623-1631.
- Conly, J.M. ,** Stein, K., Worobetz, L., Rutledge-Harding, S. 1994. The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. *Am. J. Gastroenterol.* 89: 915-923.
- Connolly, E.,** Lönnerdal, B. 2004. D(-)-lactic acid-producing bacteria. Safe to use in infant formulas. *Nutrafoods.* 3 (3): 37-49.
- Coppa, G.V.,** Gabrielli, O., Pierani, P., Catassi, C., Carlucci, A., Giorgi, P.L. 1993. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics.* 91 (3): 637-641.
- Correa, N. B.,** Peret-Filho, L.A., Penna, F.J., Lima, F.M., Nicoli, J.R. 2005. A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J. Clin. Gastroenterol.* 39: 385–389.
- Costerton, J.W.,** Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284 (5418): 1318-1322
- Creasy, R. K.,** Reznik, R., Iams, J. 2004. *Maternal-Fetal Medicine*, 5<sup>a</sup> ed. WB Saunders, Filadelfia.
- Cregan, M.D.,** Hartman, P.E. 1999. Computerized breast measurement from conception to weaning: clinical implications. *J. Hum. Lact.* 15(2):89-96.

- Crispie, F.,** Alonso-Gomez, M., O'Loughlin, C., Klostermann, K., Flynn, J., Arkins S, Meaney W, Ross RP, Hill C. 2008. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *J. Dairy Res.* 75: 374-384.
- Cukrowska, B.,** Lodinova-Zadnikova, R., Enders, C., Sonnenborn, U., Schulze, J., Tlaskalova-Hogenova, H. 2002. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with non-pathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand. J. Immunol.* 55: 204-209.
- Cummings, J.H.,** Macfarlane, G.T., Englyst, H.N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 415S-420S.
- Cummings, J.H.,** Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., Macfarlane, G.T. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* 28: 1221-1227.
- Dahesh, S.,** Hensler, M.E., Van Sorge, N.M., Gertz, R.E., Schrag, S., Nizet, V., Beall, B.W. 2008. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2915-2918.
- Dasanayake, A.P.,** Li, Y., Wiener, H., Ruby, J.D., Lee, M.J. 2005. Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *J. Periodontol.* 76: 171-177.
- de la Cochetiere, M.F.,** Piloquet, H., des Robert, C., Darmaun, D., Galmiche, J.P., Roze, J.C. 2004. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of *Clostridium*. *Pediatr. Res.* 56: 366-370.
- de Vries, M.,** Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 111: 1-66.
- Delgado, S.,** Arroyo, R., Jiménez, E., Marín, M.L., del Campo, R., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2009. Analyses of *Staphylococcus epidermidis* populations in breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiology*, in press.
- Delgado, S.,** Arroyo, R., Martín, R., Rodríguez, J.M. 2008. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infect. Dis.* 8: 51.
- Deshpande, G.,** Rao, S., Patole, S. 2007. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet.* 369 (9573): 1614-1620.
- Dey, S.K.,** Lim, H., Das, S.K., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T., Wang, H. 2004. Molecular cues to implantation. *Endocr. Rev.* 25: 341-373.
- Díaz, N.M.** 2004. Retención y mastitis. En: *Lactancia Materna: Guía para Profesionales*. Monografías de la Asociación Española de Pediatría, 5. Ergón, Madrid.

- Dicksved, J.** 2008. Exploring the human intestinal microbiome in health and disease. Doctoral dissertation. Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences. Acta Universitatis agriculturae Sueciae. 2008:30.
- Dicksved, J.,** Flöistrup, H., Bergström, A., Rosenquist, M., Pershagen, G., Scheynius, A., Roos, S., Alm, J.S., Engstrand, L., Braun-Fahrlander, C., von Mutius, E., Jansson, J.K. 2007. Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (7): 2284-2289.
- Diedrich, K.,** Fauser, B.C., Devroey, P., Griesinger, G. 2007. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum. Reprod. Update.* 13 (4): 365-377.
- DiGiulio, D.B.,** Romero, R., Amogan, H.P., Kusanovic, J.P., Bik, E.M., Gotsch, F., Kim, C.J., Erez, O., Edwin, S., Relman, D.A. 2008. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE.* 3 (8): e3056.
- Dillon, H.,** Gray, E., Pass, M., Gray, B. 1982. Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J. Infect. Dis.* 145: 794-799.
- Dominguez-Bello, M.G.,** Blaser, M.J. 2008. Do you have a probiotic in your future? *Microbes Infect.* 10 (9): 1072-1076.
- Donders, G.G.** 2007. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21 (3): 355-373.
- Donlan, R.M.,** Carr, J. 2005. *Public Health Image Library of the CDC* (Center for Disease Control and Prevention). Department of Health and Human Services. Image number 7488.
- Donovan, S.M.** 2006. Role of human milk components in gastrointestinal development: current knowledge and future needs. *J. Pediatr.* 149: S49-S61.
- dos Santos Nascimento, J.,** Fagundes, P.C., de Paiva Brito, M.A., dos Santos, K.R., do Carmo de Freire Bastos, M. 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 106: 61-71.
- Duggirala, A.,** Kenchappa, P., Sharma, S., Peeters, J.K., Ahmed, N., Garg, P., Das, T., Hasnain, S.E. 2007. High-resolution genome profiling differentiated *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with ocular infections and normal individuals. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48: 3239-3245.
- Dunne, C.,** O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (suppl): 386S-392S.
- Eady, E.A.,** Cove, J.H. 2003. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* - an emerging problem for the management

- of skin and soft tissue infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16 (2): 103-124.
- Eaton, T.J.,** Gasson, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (4): 1628-1635.
- Ebringer, A.,** Wilson, C. 2000. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. *Med. Microbiol.* 49: 305-311.
- Eckburg, P.B.,** Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, D.E., Relman, D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 308 (5728): 1635-1638.
- Edelstein, H.** 1993. Breast abscess due to *Salmonella* serogroup B, serotype reading, in a young, non-puerperal woman. *Clin. Infect. Dis.* 17: 951-952.
- Eidelman, A.I.,** Szilagyi, G. 1979. Patterns of bacterial colonization of human milk. *Obstet. Gynecol.* 53: 550-552.
- El-Haddad, M.A.,** Desai, M., Gayle, D., Ross, M.G. 2004. In utero development of fetal thirst and appetite: potential for programming. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 11: 123-130.
- El-Mohandes, A.E.,** Schatz, V., Keiser, J.F., Jackson, B.J. 1993. Bacterial contaminants of collected and frozen human milk used in an intensive care nursery. *Am. J. Infect. Control.* 21: 231-234.
- Ellis, L.A.,** Mastro, A.M., Picciano, M.F. 1996. Milk-borne prolactin and neonatal development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 1(3): 259-269.
- Emiliani, S.,** Delbaere, A., Devreker, F., Englert, Y. 2005. Embryo-maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive. *Reprod. Biomed. Online.* 10 (4): 527-540.
- ESPGHAN Committee on Nutrition** . 2004. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 38: 365-374.
- Espinoza, J.,** Chaiworapongsa, T., Romero, R., Edwin, S., Rathnasabapathy, C., Gomez, R., Bujold, E., Camacho, N., Kim, Y.M., Hassan, S. 2003. Antimicrobial peptides in amniotic fluid: Defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 13: 2-21.
- Fåk, F.,** Ahn  , S., Molin, G., Jeppsson, B., Westr  m, B. 2008a. Microbial manipulation of the rat dam changes bacterial colonization and alters properties of the gut in her offspring. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294: G148-154.
- F  k, F.,** Ahn  , S., Molin, G., Jeppsson, B., Westr  m, B. 2008b. Maternal consumption of *Lactobacillus plantarum* 299v affects gastrointestinal growth and function in the suckling rat. *Br. J. Nutr.* 100 (2): 332-338.

- Falagas, M. E.,** Rafailidis, P.I., Makris, G.C. 2008. Bacterial interference for the prevention and treatment of infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 31 (6): 518-522.
- Falagas, M. E.,** Betsi, G.I., Athanasiou, S. 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 13 (7): 657-664.
- Falk, P.G.,** Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1157-1170.
- Fanaro, R.,** Chierici, R., Guerrini, P., Vigi, V. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr.* 92 (s441): 48-55.
- Favier, C.F.,** de Vos, W.M., Akkermans, A.D. 2003. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe.* 9 (5): 219-229.
- Favier, C.F.,** Vaughan, E.E., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 219-226.
- Fernández, L.,** Delgado, S., Herrero, H., Maldonado, A., Rodríguez, J.M. 2008. The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *J. Hum. Lact.* 24: 311-316.
- Field, C.J.** 2005. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J. Nutr.* 135 (1):1-4.
- Fitzpatrick, F.,** Humphreys, H., O'Gara, J.P. 2005. The genetics of staphylococcal biofilm formation will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin. Microbiol. Infect.* 11(12): 967-973.
- FAO (Food and Agriculture Organization)/ WHO (World Health Organization).** 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina.
- Foxman, B.,** D'Arcy, H., Gillespie, B., Bobo, J. K., Schwartz, K. 2002. Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 155: 103-114.
- Franks, A.H.,** Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F., Welling, G.W. 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3336-3345.
- Franz, C.M. ,** Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzappel, W.H. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (9): 4385-4389.
- Franz, C.M.,** Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzappel, W.H. 2003. Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88 (2-3): 105-122.



- Frebourg, N.B.,** Lefebvre, S., Baert, S., Lemeland, J.F. 2000. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 38 (2): 877-880.
- Fuchs, A.** 1986. Physiology and endocrinology of lactation. En: *Obstetrics: Normal and problem pregnancies*. S.G. Gabe, J.N. Nyebil, J.L. Simpson, (eds.). New York, Churchill Livingstone, pp. 549-598.
- Fukushima, Y.,** Kawata, Y., Mizumachi, K., Kurisaki, J., Mitsuoka, T. 1999. Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. *Int. J. Food Microbiol.* 46 (3): 193-197.
- Furman, L.,** Taylor, G., Minich, N., Hack, M. 2003. The effect of maternal milk on neonatal morbidity of very low-birth-weight infants. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 157: 66-71.
- Gavin, A.,** Ostovar, K. 1977. Microbiological characterization of human milk. *J. Food Protect.* 40: 614-616.
- Gardella, C.,** Riley, D.E., Hitti, J., Agnew, K., Krieger, J.N., Eschenbach, D. 2004. Identification and sequencing of bacterial rDNAs in culture-negative amniotic fluid from women in premature labor. *Am. J. Perinatol.* 21: 319-323.
- Gartner, L. M.,** Morton, J., Lawrence, R.A., Naylor, A.J., O'Hare, D., Schanler, R.J., Eidelman, A.I.; American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. 2005. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 115 (2): 496-506.
- Geddes, D.T.** 2007. Inside the lactating breast: the latest anatomy research. *J. Midwifery Womens Health.* 52(6): 556-563.
- German, J.B.,** Freeman, S.L., Lebrilla, C.B., Mills, D.A. 2008. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.* 62: 205-218.
- German, J.B.,** Schanbacher, F.L., Lönnerdal, B., Medrano, J.F., McGuire, M.A., McManaman, J.L., Rocke, D.M., Smith, T.P., Neville, M.C., Donnelly, P., Lange, M., Ward, R. 2006. International milk genomics consortium. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 656-661.
- Gershon, M.D.** 1998. V. Genes, lineages, and tissue interactions in the development of the enteric nervous system. *Am. J. Physiol.* 275 (5 Pt 1): G869-873.
- Gewolb, I. H.,** Schwalbe, R.S., Taciak, V.L., Harrison, T.S., Panigrahi, P. 1999. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 80: F167-F173.
- Gill, S.R.,** Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R.J., Daugherty, S.C., Madupu, R., Angiuoli, S.V., Durkin, A.S., Haft, D.H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I.R., Nelson, K.E., Fraser, C.M. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* 187:2426-2438.
- Gilmore, G. L.,** Haq, B., Shaddock, R.K., Jasty, S.L., Lister, J. 2008. Fetal-maternal microchimerism in normal parous females and parous female cancer patients. *Exp. Hematol.* 36 (9): 1073-1077.
- Gilmore, M.S.,** Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R., Clewell, D.B. 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176 (23): 7335-7344.
- Giordano, N.,** Senesi, M., Battisti, E., Palumbo, F., Mondillo, S., Bargagli, G., Palazzuoli, V., Nardi, P., Gennari, C. 1996. Reactive arthritis by *Staphylococcus epidermidis*: report of an unusual case. *Clin. Rheumatol.* 15: 59-61.
- Gómez, R.,** Ghezzi, F., Romero, R., Muñoz, H., Tolosa, J., Rojas, I. 1995. Premature labor and intra-amniotic infection. *Clin. Perinatol.* 22: 281-342.
- González- Merlo, J.** 2006. *Obstetricia.* Masson S.A., Barcelona.
- Gordon, H .A.,** Pesti, L. 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationship. *Bact. Rev.* 35: 390-429.
- Gray, H.** 1918. *Anatomy of the human body.* Reino Unido, p. 1267.
- Greco, D.S.** 2008. Nutritional supplements for pregnant and lactating bitches. *Theriogenology.* 70 (3): 393-396.
- Grönlund, M.M.,** Arvilommi, H., Kero, P., Lehtonen, O.P., Isolauri, E. 2000. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal.* 83: F186-F192.
- Grönlund, M.M.,** Gueimonde, M., Laitinen, K., Kociubinski, G., Grönroos, T., Salminen, S., Isolauri, E. 2007. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy.* 37 (12): 1764-1772.
- Grönlund, M.M.,** Lehtonen, O.P., Eerola, E. y Kero, P. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after Cesarean delivery. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 28: 19-25.
- Guandalini, S.** 2008. Probiotics for children with diarrhea: an update. *J. Clin. Gastroenterol.* 42 (Suppl 2): S53-S57.
- Gueimonde, M.,** Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology.* 92 (1): 64-66.
- Guetta, E.,** Simchen, M.J., Mammon-Daviko, K., Gordon, D., Aviram-Goldring, A., Rauchbach, N., Barkai, G. 2004. Analysis of fetal blood cells in the

- maternal circulation: challenges, ongoing efforts, and potential solutions. *Stem Cells Dev.* 13 (1): 93-99.
- Gupta, P.,** Andrew, H., Kirschner, B.S., Guandalini, S. 2000. Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31:453-457.
- Hall, M.A.,** Cole, C.B., Smith, S.L., Fuller, R., Rolles, C.J. 1990. Factors influencing the presence of fecal lactobacilli in early infancy. *Arch. Dis. Child.* 65: 185-188.
- Hammond, K.A.** 1997. Adaptation of the maternal intestine during lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2: 243-252.
- Hamosh, M.** 2001. Bioactive components in human milk. *Pediatr. Clin. N. Am.* 48: 69-86.
- Hannan, N.J.,** Jones, R.L., White, C.A., Salamonsen, L.A. 2006. The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the feto-maternal interface. *Biol. Reprod.* 74 (5): 896-904.
- Hanssen, A. M.,** Kjeldsen, G., Sollid, J.U. 2004. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (1): 285-296.
- Harmsen, H.J.M.,** Wildeboer-Veloo, A.C.M., Raangs, G.C., Wagendorp, A.A., Klein, N., Bondels, J.G., Welling, G.W. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30: 61-67.
- Hayashi, H.,** Sakamoto, M., Benno, Y. 2002. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol. Immunol.* 46: 535-548.
- Heikkilä, M.P.,** Saris, P.E.J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* 95: 471-478.
- Hejnova, J.,** Dobrindt, U., Nemcova, R., Rusniok, C., Bomba, A., Frangeul, L., Hacker, J., Glaser, P., Sebo, P., Buchrieser, C. 2005. Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A034/86 (O83:K24:H31). *Microbiology.* 151 (Pt 2): 385-398.
- Helgeland, L.,** Vaage, J.T., Rolstad, B., Midtvedt, T., Brandtzaeg, P. 1996. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology.* 89: 494-501.
- Henker, J.,** Laass, M., Blokhin, B.M., Bolbot, Y.K., Maydannik, V.G., Elze, M., Wolff, C., Schulze, J. 2007. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur. J. Pediatr.* 166 (4): 311-318.
- Henker, J.,** Laass, M.W., Blokhin, B.M., Maydannik, V.G., Bolbot, Y.K., Elze, M., Wolff, C., Schreiner, A., Schulze, J.

2008. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 versus placebo for treating diarrhea of greater than 4 days duration in infants and toddlers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27 (6): 494-499.
- Hercun, M.**, Joans, B., Solbach, W., Knobloch, J.K.-M. 2008. Infections by *St. epidermidis*: Is transmission from the inanimate environment in hospitals a possible source? 60<sup>th</sup> Annual Meeting of German Society for Hygiene and Microbiology. Dresden.
- Hernandez, L.L.**, Stiening, C.M., Wheelock, J.B., Baumgard, L.H., Parkhurst, A.M., Collier, R.J. 2008. Evaluation of serotonin as a feedback inhibitor of lactation in the bovine. *J. Dairy Sci.* 91 (5): 1834-1844.
- Hill, M.J.** 1997. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.* 6: 43S-45S.
- Hillier, S.L.**, Witkin, S.S., Krohn, M.A., Watts, D.H., Kiviat, N.B., Eschenbach, D.A. 1993. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet. Gynecol.* 81: 941-948.
- Hitti, J.**, Riley, D.E., Krohn, M.A., Hillier, S.L., Agnew, K.J., Krieger, J.N., Eschenbach, D.A. 1997. Broad-spectrum bacterial ribosomal RNA polymerase chain reaction for detecting amniotic fluid infection among women in preterm labor. *Clin. Infect. Dis.* 24: 1228-1232.
- Ho, F.C.S.**, Wong, R.L.C., Lawton, J.W.M. 1979. Human colostral and breast milk cells, a light and electron microscopic study. *Acta Paediatr.* 68: 389-396.
- Hooper, L.K.**, Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., Gordon, J.I. 2001. Molecular analysis of comensal host-microbial relationship in the intestine. *Science.* 291: 881-884.
- Hooper, L.V.** 2004. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* 12 (3): 129-134.
- Hooper, L.V.**, Xu, J., Falk, P.G., Midtvedt, T., Gordon, J.I. 1999. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 9833-9838.
- Hopkins, M.J.**, Macfarlane, G.T., Furrie, E., Fite, A., Macfarlane, S. 2005. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54 (1): 77-85.
- Horcajadas, J.A.**, Riesewijk, A., Martín, J., Cervero, A., Mosselman, S., Pellicer, A., Simón, C. 2004. Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. *J. Reprod. Immunol.* 63 (1): 41-49.
- Hosea Ble wett, H.J.**, Cicalo, M.C., Holland, C.D., Field, C.J. 2008. The immunological components of human milk. *Adv. Food Nutr. Res.* 54: 45-80.
- Hoyos, A.B.** 1999. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *Int. J. Infect. Dis.* 3: 197-202.
- Hu, D.L.**, Omoe, K., Inoue, F., Kasai, T., Yasujima, M., Shinagawa, K., Nakane, A. 2008. Comparative prevalence of

- superantigenic toxin genes in meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Med. Microbiol.* 57: 1106-1112.
- Hufnagel, M.,** Liese, C., Loescher, C., Kunze, M., Proempeler, H., Berner, R., Krueger, M. 2007. Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infectious Diseases.* 7:107.
- Huovinen, P.** 2001. Bacteriotherapy: the time has come. *BMJ.* 323: 353-354.
- Hurley, W. L.** 2007a. Human milk and lactation. ANSCI 308 Lactation Biology.
- Hurley, W. L.** 2007b. Milk composition. ANSCI 308 Lactation Biology.
- Hylander, M.A.,** Strobino, D.M., Dhanireddy, R. 1998. Human milk feedings and infection among very low birth weight infants. *Pediatrics* 102 (3): e38.
- Isaacs, D.,** Barfield, C., Clothier, T., Darlow, B., Diplock, R., Ehrlich, J., Grimwood, K., Humphrey, I., Jeffery, H., Kohan, R., McNeil, R., McPhee, A., Minutillo, C., Morey, F., Tudehope, D., Wong, M. 1996. Late-onset infections of infants in neonatal units. *J. Paediatr. Child Health.* 32: 158-161.
- Isaacs, C.E.** 2005. Human milk inactivates pathogens individually, additively, and synergistically. *J. Nutr.* 135 (5): 1286-1288.
- Isolauri, E.,** Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E., Salminen, S. 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy.* 30 (11): 1604-1610.
- Isolauri, E.,** Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. y Salminen, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 444S-450S.
- Jan, G.,** Belzacq, A.S., Haouzi, D., Rouault, A., Métivier, D., Kroemer, G., Brenner, C. 2002. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ.* 9 (2): 179-188.
- Jellife, D.B.,** Jellife, E.F. 1981. Breast milk and infection. *Lancet.* 2 (8243): 419.
- Jensen, R.G.** 1999. Lipids in Human Milk. *Lipids.* 34: 1243-1271.
- Jiménez, E.,** Delgado, S., Fernández, L., García, N., Albújar, M., Gómez, A., Rodríguez, J.M. 2008a. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Res. Microbiol.* 159 (9-10): 595-601.
- Jiménez, E.,** Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albújar, M., García, N., Jarrod, M., Fernández, L., Gómez, A., Rodríguez, J.M. 2008b. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol.* 8: 143.
- Jiménez, E.,** Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2008c. Oral administration of lactobacilli strains isolated from breast milk as an

alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4650-4655.

**Jiménez, E.,** Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilicalcord blood of healthy neonates born by caesarean section. *Curr. Microbiol.* 51: 270-274.

**Jiménez, E.,** Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2008d. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 159: 187-193.

**Jirapinyo, P.,** Densupsoontorn, N., Thamonsiri, N., Wongarn, R. 2002. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants by probiotics. *J. Med. Assoc. Thai.* 85 (Suppl 2): S739-S742.

**Johnston, B.C.,** Supina, A.L., Ospina, M., Vohra, S. 2007. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2: CD004827.

**Kalliomäki, M.,** Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* 357: 1076-1079.

**Kalliomäki, M.,** Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., Isolauri, E. 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 361: 1869-1871.

**Kalliomäki, M.,** Salminen, S., Poussa, T., Isolauri, E. 2007. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119(4): 1019-1021.

**Kayser, F. H.** 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88 (2-3): 255-262.

**Kiatpapan, P.,** Murooka, Y. 2002. Genetic manipulation system in propionibacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 93 (1): 1-8.

**Kim, M.,** Kim, G., Romero, R., Shim, S.-S., Kim, E.-C., Yoon, B.H. 2003. Biovar diversity of *Ureaplasma urealyticum* in amniotic fluid: distribution, intrauterine inflammatory response and pregnancy outcomes. *J. Perinatal. Med.* 31:146-152.

**Kirjavainen, P.V.,** Apostolou, E., Arvola, T., Slaminen, S.J., Gibson, G.R., Isolauri, E. 2001. Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32: 1-7.

**Kirjavainen, P.V.,** Arvola, T., Salminen, S.J., Isolauri, E. 2002. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut.* 51: 51-55.

**Klostermann, K.,** Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C., Meaney, W. 2008. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with

- antibiotic treatment in field trials. *J. Dairy Res.* 75: 365-373.
- Koletzko, B. .**, Baker, S., Cleghorn, G., Fagundes Neto, U., Gopalan, S., Hernell, O., Seng Hock, Q., Jirapinyo, P., Lonnerdal, B., Pencharz, P., Pzyrembel, H., Ramirez-Mayans, J., Shamir, R., Turck, D., Yamashiro, Y., Zong-Yi, D. 2005. Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 41: 584-599.
- Kontiokari, T.**, Sundqvist, K., Nuutinen, M., Pokka, T., Koskela, M., Uhari, M. 2001. Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and *Lactobacillus* GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ.* 322 (7302): 1571.
- Kornman, K.S.**, Loesche, W.J. 1980. The subgingival microbial flora during pregnancy. *J. Periodont. Res.* 15:111-122.
- Kotowska, M.**, Albrecht, P., Szajewska, H. 2005. *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21: 583-590.
- Kukkonen, K.**, Savilahti, E., Haahtela, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., Tuure, T., Kuitunen, M. 2007. Probiotics and probiotic galactooligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119: 192-198.
- Kunz, C.**, Rodriguez-Palmero, M., Koletzko, B., Jensen, R. 1999. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clin. Perinatol.* 26 (2): 307-333.
- Kunz, C.**, Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 20:699-722.
- Kushwaha, R.S.**, Adrogaste, J., Isgar, B., Hale, M., Catchpole, C. 2002. Mastitis due to *Salmonella paratyphi* A. *Breast.* 11: 102-103
- Kussendrager, K.** 1993. Lactoferrin and lactoperoxydase. *Int. Food Ingrid.* 6: 17-21.
- Kvist, L.J.**, Larsson, B.W., Hall-Lord, M.L., Steen, A., Schalén, C. 2008. The role of bacteria in lactational mastitis and some considerations of the use of antibiotic treatment. *Int. Breastfeed. J.* 3:6.
- Langa, S.** 2006. Interacciones entre bacterias lácticas, células del epitelio intestinal y células del sistema inmunitario. Desarrollo de modelos "in vitro". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Langman, J.** 1969. *Embriología médica: desarrollo humano normal y anormal*. Interamericana, México D.F.
- Larsen, H. D.**, Aarestrup, F.M., Jensen, N.E. 2002. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and  $\beta$ -hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in

- Europe and USA. *Vet. Microbiol.* 85: 61-67.
- Lawrence, R. A.,** Lawrence, R. M. 2005. *Breastfeeding. A guide for the medical profession.* 6th ed. St. Louis: Mosby.
- Lawrence, R.M.,** Pane, C.A. 2007. Human breast milk: Current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc Health Care.* 37: 7-36.
- Le Thomas, I.,** Mariani-Kurkgjian, P., Collignon, A., Gravet, A., Clermont, O., Brahimi, N., Gaudelus, J., Aujard, Y., Navarro, J., Beaufils, F., Bingen, E. 2001. Breast milk transmission of a panton-valentine-leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* strain causing infantile pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 39: 728-729.
- Lecuit, M.,** Abachin, E., Martin, A., Poyart, C., Pochart, P., Suarez, F., Bengoufa, D., Feuillard, J., Lavergne, A., Gordon, J.I., Berche, P., Guillevin, L., Lortholary, O. 2004. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N. Engl. J. Med.* 350: 239-248.
- Lee, K.,** Lee, M., Lee, Y. 2008. Safety assessment of commercial *Enterococcus* probiotics in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (5): 942-945.
- Leitner, G.,** Yadlin, B., Glickman, A., Chaffer, M., Saran, A. 2000. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.* 69: 181-184.
- Lennox-King, S.M.J.,** O'Farrell, S.M., Bettelheim, K.A. y Shooter, R.A. 1976a. Colonization of caesarean section babies by *Escherichia coli*. *Infection* 4: 134-138.
- Lennox-King, S.M.J.,** O'Farrell, S.M., Bettelheim, K.A. y Shooter, R.A. 1976b. *Escherichia coli* isolated from babies delivered by caesarean section and their environment. *Infection* 4: 130-145.
- León, R.,** Silva, N., Ovalle, A., Chaparro, A., Ahumada, A., Gajardo, M., Martínez, M., Gamonal, J. 2007. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J. Periodontol.* 78: 1249-1255.
- Li, R.,** Fein, S.B., Chen, J., Grummer-Strawn, L.M. 2008. Why mothers stop breastfeeding: mothers' self-reported reasons for stopping during the first year. *Pediatrics.* 122 Suppl 2: S69-S76.
- Lichtman, S.M.** 2001. Bacterial translocation in humans. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 33: 1-10.
- Lin, H.C.,** Hsu, C.H., Chen, H.L., Chung, M.Y., Hsu, J.F., Lien, R.I., Tsao, L.Y., Chen, C.H., Su, B.H. 2008. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics.* 122(4): 693-700.
- Lin, H.C.,** Su, B.H., Chen, A.C., Lin, T.W., Tsai, C.H., Yeh, T.F., Oh, W. 2005. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 115: 1-4.
- Lin, Y.,** Xia, L., Turner, J.D., Zhao, X. 1995. Morphologic observation of



- neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 56 (2): 203-207.
- Lindemann, P.C.,** Foshaugen, I., Lindemann, R. 2004. Characteristics of breast milk and serology of women donating breast milk to a milk bank. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal.* 89: F440-F441.
- Lindmark-Månsson, H.,** Akesson, B. 2000. Antioxidative factors in milk. *Br. J. Nutr.* 84 (Suppl 1): S103-S110.
- Llewelyn, M.,** Cohen, J. 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect. Dis.* 2: 156-162.
- Lu, L.,** Walker, W.A. 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (6): 1124S-1130S.
- Lucas, A.,** Cole, T.J. 1990. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* 336 (8730): 1519-1523.
- Ludington-Hoe, S.M.,** Anderson, G.C., Simpson, S., Hollingsead, A., Argote, L.A., Medellin, G., Rey, H. 1993. Skin-to-skin contact beginning in the delivery room for Colombian mothers and their preterm infants. *J. Human. Lact.* 9: 241-242.
- Lundequist, B.,** Nord, C.E., Winberg, J. 1985. The composition of the fecal microflora in breastfed and bottle-fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatr. Scand.* 74: 45-51.
- Lunghi, L.,** Ferretti, M.E., Medici, S., Biondi, C., Vesce, F. 2007. Control of human trophoblast function. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5: 6.
- Lupp, C.,** Finlay, B.B. 2005. Intestinal Microbiota. *Curr. Biol.* 15: R235-R236.
- Luthje, P.,** Schwarz, S. 2006. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 966-969.
- Lyall, F.** 2005. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy- a review. *Placenta.* 26 Suppl A: S31-S36.
- MacFie, J.** 2004. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br. Med. Bull.* 71: 1-11.
- MacGregor, R.R.,** Tunnessen, W.W. 1973. The incidence of pathogenic organisms in the normal flora of the neonates external ear and nasopharynx. *Clin. Pediatr.* 12: 697-700.
- Mack, D.,** Davies, A.P., Harris, L.G., Rohde, H., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K. 2007. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2): 399-408.
- Mackie, R.I.,** Sghir, A., Gaskins, H.R. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1035S-1045S.
- Macpherson, A.J.,** Harris, N.L. 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 478-485.

- Macpherson, A.J.,** Uhr, T. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. 303: 1662–1665.
- Magalhaes, J.G.,** Tattoli, I., Girardin, S.E. 2007. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin. Immunol.* 19 (2): 106-115.
- Mah, K.W.,** Björkstén, B., Lee, B.W., van Bever, H.P., Shek, L.P., Tan, T.N., Lee, Y.K., Chua, K.Y. 2006. Distinct pattern of commensal gut microbiota in toddlers with eczema. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 140 (2): 157-163.
- Mann, S.E.,** Nijland, M.J., Ross, M.G. 1996. Mathematic modeling of human amniotic fluid dynamics. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175 (4 Pt 1):937-944.
- Mantere-Alhonen, S.** 1995. Propionibacteria used as probiotics - A review. *Lait*. 75: 447-452
- Manzur, A.,** Domínguez, A.M., Pujol, M., González, M.P., Limon, E., Hornero, A., Martín, R., Gudíol, F., Ariza, J. 2008. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (4): 377-380.
- Mariotti, A.** 1999. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann. Periodontol.* 4 (1): 7-14.
- Markenson, G.R.,** Martin, R.K., Tillotson-Criss, M., Foley, K.S., Stewart, R.S., Yancey, M. 1997. The use of the polymerase chain reaction to detect bacteria in amniotic fluid in pregnancies complicated by preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177: 1471-1477.
- Maroulis, I.,** Spyropoulos, C., Zolota, V., Tzorakoleftherakis, E. 2008. Mammary tuberculosis mimicking breast cancer: a case report. *J. Med. Case Reports*. 2: 34.
- Marteau, P.R.,** de Vrese, M., Cellier, C.J., Schrezenmeir J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr.* Feb;73(2 Suppl):430S-436S.
- Martín-Calama, J.** 2004. Lactogénesis. Cap. 4. En: *Lactancia Materna: guía para profesionales*. Monografías de la Asociación Española de Pediatría, 5. Ergon, Madrid, pp 45-58.
- Martín R.,** Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., Rodríguez, J.M. 2007a. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women. *Res. Microbiol.* 158: 31-37.
- Martín, R.,** Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J.M. 2007b. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2638-2644.
- Martín, R.,** Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M.L., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J.M. 2008a. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (4): 965-969.
- Martín R.,** Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant

- feces and breast milk of a mother-child pair. *Int. J. Food Microbiol.* 112: 35-43.
- Martín, R.,** Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J. M. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 121-127.
- Martín, R.,** Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Ped.* 143: 754-758.
- Martín, R.,** Olivares, M., Marín, M. L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J. M. 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J. Human Lact.* 21: 8-17.
- Martín, R.,** Soberón, N., Vázquez, F., Suárez, J.E. 2008b. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26 (3): 160-167.
- Martineau, F.,** Picard, F.J., Lansac, N., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G. 2000. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 231-238.
- Matheson, I.,** Aursnes, I., Horgen, M., Aabo, O., Melby, K. 1988. Bacteriological findings and clinical symptoms in relation to clinical outcome in puerperal mastitis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 67: 723-726.
- Matheson, M.C.,** Erbas, B., Balasuriya, A., Jenkins, M.A., Wharton, C.L., Tang, M.L., Abramson, M.J., Walters, E.H., Hopper, J.L., Dharmage, S.C. 2007. Breast-feeding and atopic disease: a cohort study from childhood to middle age. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120 (5): 1051-1057.
- Matsuda, M.,** Imaoka, T., Vomachka, A.J., Gudelsky, G.A., Hou, Z., Mistry, M., Bailey, J.P., Nieport, K.M., Walther, D.J., Bader, M., Horseman, N.D. 2004. Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell.* 6 (2): 193-203.
- Matsumiya, Y.,** Kato, N., Watanabe, K., Kato, H. 2002. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.* 8: 43-49.
- McCarthy, J.,** O'Mahony, L., O'Callaghan, L., Sheil, B., Vaughan, E. E., Fitzsimons, N., Fitzgibbon, J., O'Sullivan, G. C., Kiely, B., Collins, J. K., Shanahan, F. 2003. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut.* 52: 975-980.
- McGhee, J.R.,** Kiyono, H. 1999. The mucosal immune system. En: *Fundamental Immunology*. Paul, E. (ed). Lippincott-raven Publishers, Philadelphia.

- McManaman, J.L.,** Neville, M.C. 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 629–641.
- Melchior, M.B.,** Vaarkamp, H., Fink-Gremmels, J. 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* 171: 398-407.
- Mehr, S.S.,** Sadowsky, J.L., Doyle, L.W., Carr, J. 2002. Sepsis in neonatal intensive care in the late 1990s. *J. Paediatr. Child Health.* 38 (3): 246-251.
- Mesiano, S.,** Welsh, T.N. 2007. Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18: 321-331.
- Michaelsen, K.F.,** Mortensen, E.L., Reinisch, J.M. 2000. Duration of breastfeeding and linear growth. *Adv. Exp. Med. Biol.* 478: 183-191.
- Michie, C. A.** 1998. The long term effects of breastfeeding: a role for the cells in breast milk? *J. Trop. Pediatr.* 44: 2-3.
- Miyazawa, E.,** Iwabuchi, A., Yoshida, T. 1996. Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorus, calcium and magnesium in germfree and conventionalized rats. *Nutr. Res.* 16: 603-613.
- Moazzez, A.,** Kelso, R.L., Towfigh, S., Sohn, H., Berne, T.V., Mason, R.J. 2007. Breast abscess bacteriologic features in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemics. *Arch. Surg.* 142: 881-884.
- Mohan, R.,** Koebnick, C., Schildt, J., Schmidt, S., Mueller, M., Possner, M., Radke, M., Blaut, M. 2006. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J. Clin. Microbiol.* 44 (11): 4025-4031.
- Mohan, R.,** Koebnick, C., Schildt, J., Mueller, M., Radke, M., Blaut, M. 2008. Effects of *Bifidobacterium lactis* supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin and IgA in preterm infants. *Pediatr. Res.* 64 (4): 418-422.
- Monroe, D.** 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* 5 (11): e307.
- Moore, W.E.C.,** Moore, L.H. 1995. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3202-3207.
- Moore, F.A.,** Moore, E.E., Poggetti, R.S., Read, R.A. 1992. Postinjury shock and early bacteremia: a lethal combination. *Arch. Surg.* 127: 893–898.
- Moreau, M.C.,** Ducluzeau, R., Guy-Grand, D., Muller, M.C. 1978. Increase in the population of duodenal IgA plasmocytes in axenic mice monoassociated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect. Immun.* 21: 532-539.
- Mori, M.,** Ishikawa, G., Luo, S.S., Mishima, T., Goto, T., Robinson, J.M., Matsubara, S., Takeshita, T., Kataoka, H., Takizawa, T. 2007. The cytotrophoblast layer of human chorionic villi becomes thinner but maintains its structural integrity during gestation. *Biol. Reprod.* 76 (1):164-172.

- Morino, C.,** Winn, S.M. 2007. Raynaud's phenomenon of the nipples: an elusive diagnosis. *J. Human Lact.* 23: 191-193.
- Morrow, A.L.,** Rangel, J.M. 2004. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 15 (4): 221-228.
- Morton, J.A.** 1994. The clinical usefulness of breast milk sodium in the assessment of lactogenesis. *Pediatrics.* 93: 802-806.
- Mundy, L.M.,** Sahm, D.F., Gilmore, M. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13 (4): 513-522.
- Neville, W.A.,** Tisler, C., Bhattacharya, A., Anklam, K., Gilbertson-White, S., Hamilton, R., Adler, K., Dasilva, D.F., Roberg, K.A., Carlson-Dakes, K.T., Anderson, E., Yoshihara, D., Gangnon, R., Mikus, L.D., Rosenthal, L.A., Gern, J.E., Lemanske, R.F. Jr. 2003. Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (4): 740-746.
- Neifert, M.R.,** McDonough, S.L., Neville, M.C. 1981. Failure of lactogenesis associated with placental retention. *Am. J. Obstetr. Gynecol.*, 140: 447-448.
- Neu, J.,** Douglas-Escobar, M., Lopez, M. 2007. Microbes and the developing gastrointestinal tract. *Nutr. Clin. Pract.* 22 (2): 174-182.
- Neutra, M. R.** 1999. M cells in antigen sampling in mucosal tissues. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 236: 17-32.
- Neutra, M.R.,** Pringault, E., Kraehenbuhl, J.P. 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 275-300.
- Neville, M.C.** 1993. Milk secretion: an overview. En: Reviews of mammary gland (<http://mammary.nih.gov/reviews/lactation/Neville001/index.html>).
- Neville, M.C.,** Allen, J.C., Archer, P., Seacat, J., Casey, C., Lutes, V., Rasbach, J., Neifert, M. 1991. Studies in human lactation: Milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 81-93.
- Neville, M.C.,** Allen, J.C., Watters, C. 1983. The mechanisms of milk secretion. En: *Lactation: Physiology, Nutrition and Breast-Feeding*. Neville, M.C., Neifert, M.R. (eds.). Plenum Press, New York, p. 50.
- Neville, M.C.,** McFadden, T.B., Forsyth, I. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 7 (1): 49-66.
- Neville, M.C.,** Morton, J. 2001. Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II. *J. Nutr.* 131: 3005S-3008S.
- Newburg, D.S.** 2005. Innate immunity and human milk. *J. Nutr.* 135: 1308-1312.
- Newburg, D.S.,** Walker, W.A. 2007. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr. Res.* 61( 1): 2-8.

- Ng, D.K.,** Lee, S.Y.R., Leung, L.C.K., Wong, S.F., Ho, J.C.S. 2004. Bacteriological screening of expressed breast milk revealed a high rate of bacterial contamination in Chinese women. *J. Hospital Infect.* 58: 146–150.
- Ninonuevo, M.R.,** Park, Y., Yin, H., Zhang, J., Ward, R.E., Clowers, B.H., German, J.B., Freeman, S.L., Killeen, K., Grimm, R., Lebrilla, C.B. 2006. A strategy for annotating the human milk glycome. *J. Agric. Food Chem.* 54 (20): 7471-7480.
- Nooh, M.M.,** El-Gengehi, N., Kansal, R., David, C.S., Kotb, M. 2007. HLA transgenic mice provide evidence for a direct and dominant role of HLA class II variation in modulating the severity of streptococcal sepsis. *J. Immunol.* 178: 3076-3083.
- Noverr, M.,** Huffnagle, G.B. 2004. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol.* 12: 562-568.
- Nyirjesy, P.,** Weitz, M.V., Grody, M.H.T., Lorber, B. 1997. Over-the-counter and alternative medicines in the treatment of chronic vaginal symptoms. *Obstet. Gynecol.* 90: 50-53.
- O'Gara, J.P.,** Humphreys, H. 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.* 50:582-587.
- O'Gara, J.P.** 2007. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 179-188.
- O'Hara, A.M.,** Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports.* 7 (7): 688-693.
- Ogundele, M.O.** 2001. A viewpoint of mucosal immunity in relation to early feeding method. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36: 341-355.
- Olivares, M.,** Díaz-Ropero, M. P., Martín, R., Rodríguez, J. M., Xaus, J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol.* 101: 72-79.
- Oliveira, M.,** Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., Vilela, C.L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* 118:133-140.
- OMS (Organización Mundial de la Salud).** 2000. Mastitis: causes and management. Geneva.
- OMS (Organización Mundial de la Salud).** 2001. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Geneva.
- Osborn, D.A.,** Sinn, J.K. 2007. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst. Rev.* (4): CD006475.
- Osterman, K.L.,** Rahm, V.A. 2000. Lactation mastitis: bacterial cultivation of breast milk, symptoms, treatment and outcome. *J. Hum. Lact.* 16: 297–302.
- Ott, S.J.,** Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U.R., Timmis, K.N. Schreiber, S. 2004.

- Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*. 53: 685–693.
- Ouwehand, A.C.**, Salminen, S., Arvola, T., Ruuska, T., Isolauri, E. 2004. Microbiota composition of the intestinal mucosa: association with fecal microbiota? *Microbiol. Immunol.* 48: 497-500
- Oyarzún, E.**, Yamamoto, M., Kato, S., Gómez, R., Lizama, L., Moenne, A. 1998. Specific detection of 16 micro-organisms in amniotic fluid by polymerase chain reaction and its correlation with preterm delivery occurrence. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179 (5): 1115-1119.
- Page, S.M.**, McKenna, D.S. 2006. Vasospasm of the nipple presenting as painful lactation. *Obstet. Gynecol.* 108: 806-808.
- Palmer, C.**, Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., Brown, P.O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5 (7): e177.
- Park, H.K.**, Shim, S.S., Kim, S.Y., Park, J.H., Park, S.E., Kim, H.J., Kang, B.C., Kim, C.M. 2005. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J. Microbiol.* 43 (4): 345-353.
- Parracho, H.**, McCartney, A.L., Gibson, G.R. 2007. Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 66: 405–411.
- Parsonnet, J.**, Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelstein, J.H., Orentreich, N, Sibley, R.K. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325:1127–1131.
- Pavón, P.**, Parra, I., Aparicio, M., Arroba, M.L. 2007. Alimentación del lactante sano. En: *Manual Práctico de Nutrición en Pediatría*. Muñoz, M.T., Suárez, L. (eds). Ergon, Madrid, pp. 41-60.
- Penders, J.**, Vink, C., Driessen, C., London, N., Thijs, C., Stobberingh, E.E. 2005. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 243 (1): 141-147.
- Penders, J.**, Thijs, C., Vink, C., Stelma, F.F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P.A., Stobberingh, E.E. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118: 511-521.
- Pérez, P.F.**, Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E.J., Donnet-Hughes, A. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics*. 119 (3): e724-e732.
- Pettker, C.M.**, Buhimschi, I.A., Magloire, L.K., Sfakianaki, A.K., Hamar, B.D., Buhimschi, C.S. 2007. Value of placental microbial evaluation in diagnosing intra-amniotic infection. *Obstet. Gynecol.* 109: 739-749.
- Picó, C.**, Sánchez, J., Oliver, P., Miralles, O., Ceresi, E., Palou, A. 2007. Role of leptin present in maternal milk in the control of energy balance during the

- post-natal period. *Genes Nutr.* 2: 139-141.
- Piette, A.,** Verschraegen, G. 2009. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet. Microbiol.* 134 (1-2): 45-54.
- Pijnenborg, R.,** Vercruysse, L., Hanssens, M. 2006. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta.* 27 (9-10): 939-958.
- Pijnenborg, R.,** Vercruysse, L., Verbist, L., Van Assche, F.A. 1998. Interaction of interstitial trophoblast with placental bed capillaries and venules of normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta.* 19 (8): 569-575.
- Pillai, S.K.,** Sakoulas, G., Gold, H.S., Wennersten, C., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C. Jr, Inouye, R.T. 2002. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 40 (7): 2651-2652.
- Playford, R.J.,** Macdonald, C.E., Johnson, W.S. 2000. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 5-14.
- Pohjavuori, E.,** Viljanen, M., Korpela, R., Kuitunen, M., Tiittanen, M., Vaarala, O., Savilahti, E. 2004. *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114: 131-136.
- Puopolo, K.M.,** Madoff, L.C., Eichenwald, E.C. 2005. Early-onset group B streptococcal disease in the era of maternal screening. *Pediatrics.* 115: 1240-1246.
- Quesada-Chanto, A.,** Afschar, A.S., Wagner, F. 1994. Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses of sugar. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 378-383.
- Rappé, M.S.,** Giovannoni, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369-394.
- Rautava, S.,** Kalliomäki, M., Isolauri, E. 2002. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109:119-121.
- Rautava, S.,** Ruuskanen, O., Ouwehand, A., Salminen, S., Isolauri, E. 2004. The hygiene hypothesis of atopic disease-an extended version. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 38 (4): 378-388.
- Reddy, P.,** Qi, C., Zembower, T., Noskin, G.A., Bolon, M. 2007. Postpartum mastitis and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 298-301.
- Redline RW.** 2004. Placental inflammation. *Semin. Neonatol.* 9 (4): 265-274.
- Regan, J.,** Klebanoff, M., Nugent, R. 1991. Vaginal infections and prematurity study group. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 77: 604-610.
- Reid, G.** 2002. Probiotics for urogenital health. *Nutr. Clin. Care.* 5: 3-8.



- Reid, G.,** Bruce, A.W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J., Henning, B. 2001. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 30: 49-52.
- Reid, G.,** Charbonneau, D., Erb, J., Kochanowski, B., Beuerman, D., Poehner, R., Bruce, A.W. 2003. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35 (2): 131-134.
- Rench, M. A.,** Baker, C.J. 1989. Group B streptococcal breast abscess in a mother and mastitis in her infant. *Obstet. Gynecol.* 73: 875-877.
- Rennison, M.E.,** Kerr, M.A., Addey, C.V.P., Handel, S.E., Turner, M.D., Wilde, C.J., Burgoyne, R.D. 1993. Inhibition of constitutive protein secretion from lactating mouse mammary epithelial cells by FIL (Feed-back Inhibitor of Lactation), a secreted milk protein. *J. Cell Sci.* 106(2): 641-648.
- Rescigno, M.,** Urbano, M., Valsazina, B., Francoloni, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., Ricciardi-Castagnoli, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol.* 2: 361-367.
- Reviriego, C.,** Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M. 2005. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21: 131-137.
- Rhee, K.J.,** Sethupathi, P., Driks, A., Lanning, D.K., Knight, K.L. 2004. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J. Immunol.* 172 (2): 1118-1124.
- Rich, M.,** Deighton, L., Roberts, L. 2005. Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet. Microbiol.* 111: 237-240.
- Rinne, M.,** Gueimonde, M., Kalliomäki, M., Hoppu, U., Salminen, S.J., Isolauri, E. 2005a. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43: 59-65.
- Rinne, M.,** Kalliomäki, M., Arvilommi, H., Salminen, S., Isolauri, E. 2005b. Effect of probiotics and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/Enterococcus* microbiota and humoral immune responses. *J. Pediatr.* 147: 186-191.
- Riordan, J. M.,** Nichols, F.H. 1990. A descriptive study of lactation mastitis in long-term breastfeeding women. *J. Hum. Lact.* 6: 53-58.
- Roberfroid, M.B.,** Bornet, F., Bouley, C., Cummings, J.H. 1995. Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an International Life Science Institute (ILSI) [Europe], workshop held in Barcelona, Spain. *Nutr. Rev.* 53: 127-130.

- Robinson, R.** 2008. For Mammals, Loss of Yolk and Gain of Milk Went Hand in Hand. *PLoS Biol.* 6(3): e77.
- Rodríguez, A.V.,** Baigorí, M.D., Alvarez, S., Castro, G.R., Oliver, G. 2001. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Lactobacillus rhamnosus* with capacity to translocate. *FEMS Microbiol. Lett.* 204 (1): 33-38.
- Rodríguez, J.M.,** Dalmau, J. 2006a Probióticos para el binomio madre-hijo (I). *Acta Pediatr. Esp.* 65: 452-457.
- Rodríguez, J.M.,** Dalmau, J. 2006b Probióticos para el binomio madre-hijo (II). *Acta Pediatr. Esp.* 65: 513-518.
- Rodríguez, J.M.,** Jiménez, E., Merino, V., Maldonado, A., Marín, M.L., Fernández, L., Martín, R. 2006. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr. Esp.* 66: 77-82
- Rohde, H.,** Kalitzky, M., Kröger, N., Scherpe, S., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.-M., Zander, A.R., Mack D. 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5614-5619.
- Roitt, I.** 2001. *Essential Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Romero, R.,** Mazor, M., Morrotti, R., Avila, C., Oyarzun E., Insunza, A., Parra, M., Behnke, E., Montiel, F., Cassell, G.H. 1992. Infection and labor. VII. Microbial invasion of the amniotic cavity in spontaneous rupture of membranes at term. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166: 129-133.
- Romero, R.,** Espinoza, J., Goncalves, L.F., Kusanovic, J.P., Friel, L.A., Nien, J.K. 2006. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 11: 317-326.
- Romero, R.,** Kusanovic, J.P., Espinoza, J., Gotsch, F., Nhan-Chang, C.L., Erez, O., Kim, C.J., Khalek, N., Mittal, P., Goncalves, L.F., Schaudinn, C., Hassan, S.S., Costerton, J.W. 2007. What is amniotic fluid "sludge"? *Ultrason. Obstet. Gynecol.* 30: 793-798.
- Rosenfeldt, V.,** Benfeldt, E., Valerius, N.H., Paerregaard, A., Michaelsen, K.F. 2004. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestine permeability in children with atopic dermatitis. *J. Pediatr.* 145: 612-616.
- Rouse, D.J.,** Lincoln, T., Cliver, S., Lyon, M.D., Andrews, W.W., Hauth, J.C. 2003. Intrapartum chlorhexidine vaginal irrigation and chorioamnion and placental microbial colonization. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 83 (2): 165-169.
- Roux, M.E.,** McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J.M., Weisz-Carrington, P., Lamm, M.E. 1977. Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *J. Exp. Med.* 146: 1311-1322.
- Russell, A .R.B.,** Steer, P.J. 2008. Antibiotics in preterm labour – the OTACLE speaks. *The Lancet.* 372: 1276-1278.
- Ryan, M.P.,** Meaney, W.J., Ross, R.P., Hill, C. 1998. Evaluation of lacticin

- 3147 and teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2287-2290.
- Saavedra, J.M.** 2007. Use of probiotics in pediatrics: Rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutr. Clin. Pract.* 22: 351-365
- Saavedra, J.M.,** Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A., Yolken, R.H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* 344: 1046-1049.
- Saint, L.,** Smith, M., Hartmann, P.E. 1984. The yield and nutrient content of colostrum and milk of women from giving birth to 1 month post-partum. *Br. J. Nutr.* 52 (1): 87-95.
- Sakata, H.,** Yoshioka, H., Fujita, K. 1985. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur. J. Pediatr.* 144: 186-190.
- Sala-Vila, A.,** Castellote, A.I., Rodriguez-Palmero, M., Campoy, C., López-Sabater, M.C. 2005. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): Changes during lactation. *Nutrition.* 21: 467-473.
- Salminen, S.,** Isolauri, E. 2006. Intestinal colonization, microbiota and probiotics. *J. Pediatr.* 149: S115-S120
- Salminen, S.,** von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassard, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics. A review. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 93-106.
- Salmon, H.,** Oliver, M., Delouis, G., Paly, J., Fevre, J. 1984. A study of lymphocyte migration into the mammary gland of pregnant sows by in vivo labelling of lymphocytes. En: *Cell mediated immunity.* Quinn P.J. (eds). Seminar CEE, pp. 216-223.
- Sanderson, A.,** Leid, J., Hunsaker, D. 2006. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 116 (7): 1121-1126.
- Sase, M.,** Miwa, I., Sumie, M., Nakata, M., Sugino, N., Okada, K., Osa, A., Miike, H., Ross, M.G. 2005. Gastric emptying cycles in the human fetus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193 (3 Pt 2):1000-1004.
- Satokari, R.,** Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. 2008. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Lett. Appl. Microbiol. In press*
- Savage, D.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract. 1977. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 107-133.
- Schack-Nielsen, L.,** Larnkjaer, A., Michaelsen, K.F. 2005. Long term effects of breastfeeding on the infant and mother. *Adv. Exp. Med. Biol.* 569: 16-23.
- Schack-Nielsen, L.,** Michaelsen, K.F. 2006. Breast feeding and future health. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 9: 289-296.

- Schanler, R.J.,** Shulman, R.J., Lau, C. 1999. Feeding strategies for premature infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics*. 103: 1150–1157.
- Schultz, M.,** Göttl, C., Young, R.J., Iwen, P., Vanderhoof, J.A. 2004. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 38 (3): 293-297.
- Schwarze, E.** 1984. *Compendio de Anatomía Veterinaria. Embriología.* Acribia D.L. Zaragoza.
- Schwartz, A.,** Gruhl, B., Löbnitz, M., Michel, P., Radke, M., Blaut, M. 2003. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr. Res.* 54 (3): 393-399.
- SCF (Scientific Committee on Food)** . 2003. Minutes' statement of the Scientific Committee on Food addressing the limitations of extrapolating tolerable upper intake levels of nutrients for children (expressed on 4 April). SCF/CS/NUT/IF/65 Final. Annex XIV, Minutes of the 137th Plenary Meeting of the Scientific Committee on Food held on 2–4 April 2003 in Brussels. SCF/CS/PLEN/MINS 137 (14 May). [http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out198\\_en.pdf](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out198_en.pdf)
- Sears, P.M.,** Smith, B.S., Stewart, W.K., Gonzalez, R.N. 1992. Evaluation of a nisin based germicidal formulation on teat skin of live cows. *J. Dairy Sci.* 75: 3185-3190.
- Seelig, L.L. Jr.,** Beer, A.E. 1981. Intraepithelial leukocytes in the human mammary gland. *Biol. Reprod.* 24 (5): 1157-1163.
- Seksik, P.,** Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., Doré, J. 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut.* 52: 237–242.
- Seong, H.S.,** Lee, S.E., Kang, J.H., Romero, R., Yoon, B.H. 2008. The frequency of microbial invasion of the amniotic cavity and histologic chorioamnionitis in women at term with intact membranes in the presence or absence of labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199: 375 e1-5.
- Shanahan, F.** 2002. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 16 (6): 915-931.
- Shanahan, F.** 2005. Physiological basis for novel drug therapies used to treat the inflammatory bowel disease. I. Pathophysiological basis and prospects for probiotic therapy in inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288: G417-G421.
- Sheil, B.,** McCarthy, J., O'Mahony, L., Bennett, M.W., Ryan, P., Fitzgibbon, J.J., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F. 2004. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut.* 53: 694-700.
- Shroff, K.E.,** Meslin, K., Cebra, J.J. 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune

- response while permanently colonizing the gut. *Infect. Immun.* 63: 3904-3913.
- Sicherer, S.H.,** Sampson, H.A. 1999. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: pathophysiology, epidemiology, diagnosis, and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 (3 Pt 2): S114-S122.
- Simon, G.L.,** Gorbach, S.L. 1982. Intestinal microflora. *Med. Clin. North Am.* 66: 557-574
- Sisk, P.M.,** Lovelady, C.A., Dillard, R.G., Gruber, K.J., O'Shea, T.M. 2007. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J. Perinatol.* 27 (7): 428-433.
- Skovbjerg, S.,** Roos, K., Holm, S.E., Grahn Håkansson, E., Nowrouzian, F., Ivarsson, M., Adlerberth, I., Wold, A.E. 2009. Spray bacteriotherapy decreases middle ear fluid in children with secretory otitis media. *Arch. Dis. Child.* 94 (2): 92-98.
- Smith, J.A.** 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leuk. Biol.* 56: 672-686.
- Smyth, D.S.,** Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., Deobald, C.F., Bohach, G.A., Smyth, C.J. 2005. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J. Med. Microbiol.* 54: 401-411.
- Soler Palacín, P.,** Garzón Lorenzo, P., Castilla Fernández, Y., Arranz Amo, J.A., Scheider, S., Tormo Carnicé, R., del Toro Riera, M., Figueras Nadal, C. 2006. Acidosis D-láctica en un paciente de 11 años con síndrome de intestino corto. *An. Pediatr. (Barc).* 64 (4): 385-387.
- Soltys, J.,** Quinn, M. 1999. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infect. Immun.* 67: 6293-6302.
- Soriani, M.,** Santi, I., Taddei, A., Rappuoli, R., Grandi, G., Telford, J.L. 2006. Group B *Streptococcus* crosses human epithelial cells by a paracellular route. *J. Infect. Dis.* 193 (2): 241-250.
- Soto, E.,** Espinoza, J., Nien, J.K., Kusanovic, J.P., Erez, O., Richani, K., Santolaya-Forgas, J., Romero, R. 2007. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J. Matern. Fetal Neonatal. Med.* 20: 15-22.
- Stafford, I.,** Hernandez, J., Laibl, V., Sheffield, J., Roberts, S., Wendel, G. 2008. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with puerperal mastitis requiring hospitalization. *Obstet. Gynecol.* 112: 533-537.
- Stappenbeck, T.S.,** Hooper, L.V., Gordon, J.I. 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99 (24): 15451-15455.
- Stark, P.L.,** Lee, A. 1982. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first

- year of life. *J. Med. Microbiol.* 15: 189–203.
- Staun-Ram, E.,** Shalev, E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3: 56.
- Steel, J.H.,** Malatos, S., Kennea, N., Edwards, D., Miles, L., Duggan, P., Reynolds, P.R., Feldman, R.G., Sullivan, M.H. 2005. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr. Res.* 57: 404-411.
- Steijns, J.M.,** van Hooijdonk, A.C. 2000. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br. J. Nutr.* 84 (Suppl 1): S11-S17.
- Steinwender, G.,** Schimpl, G., Sixl, B., Kerbler, S., Ratschek, M., Kilzer, S., Hollwarth, M.E., Wenzl, H.H. 1996. Effect of early nutritional deprivation and diet on translocation of bacteria from the gastrointestinal tract in the newborn rat. *Pediatr. Res.* 39 (3): 415-420.
- Stewart, P. S.,** Costerton, J.W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358 (9276): 135-138.
- Strachan, D.P.** 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 299: 1259-1260.
- Stull, M.A.,** Pai, V., Vomachka, A.J., Marshall, A.M., Jacob, G.A., Horseman, N.D. 2007. Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (42): 16708-16713.
- Suau, A.,** Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4799–4807.
- Swart, P.J.,** Kuipers, E.M., Smit, C., Van Der Strate, B.W., Harmsen, M.C., Meijer, D.K. 1998. Lactoferrin. Antiviral activity of lactoferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443: 205-213.
- Sybesma, W.,** Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M.H., Hugenholtz, J. 2003. Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4542-4548.
- Tankanow, R.M.,** Ross, M.B., Ertel, I.J., Dickinson, D.G., McCormick, L.S., Garfinkel, J.F. 1990. A double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *DICP.* 24: 382–384.
- Tanneau, G.M.,** Hibrand-Saint Oyant, L., Chevaleyre, C.C., Salmon, H.P. 1999. Differential recruitment of T- and IgA B-lymphocytes in the developing mammary gland in relation to homing receptors and vascular addressins. *J Histochem. Cytochem.* 47 (12): 1581-1592.
- Tannock, G.W.** 1994. The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract. En: *Human health: The contribution of the microorganisms.* S.A.W. Gibson (ed.), Springer-Verlag, Londres, pp. 1-16.

- Tannock, G.W.** 1995. More than smell: the complexity of the normal microflora. In: *Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body*. Chapman and Hall, London. pp.1-35.
- Tannock, G.W.** 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. *Trends Biotechnol.* 15: 270-274.
- Tannock, G.W.** 2001. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: S410-S414.
- Tannock, G.W., Fuller, R., Smith, S.L., Hall, M.A.** 1990. Plasmid profiling of members of the family *Enterobacteriaceae*, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* 28 (6): 1225-1228.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J.** 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81 (1): 1-10.
- Thadepalli, H., Appleman, M.D., Maidman, J.E., Arce, J.J., Davidson, E.C.** 1977. Antimicrobial effect of amniotic fluid against anaerobic bacteria. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 127: 250-254.
- Thibault, H., Hubert-Jacquín, C., Goulet, O.** 2004. Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39: 147-152.
- Thibodeau, J., Cloutier, I., Lavoie, P., Labrecque, N., Mourad, W., Jardetzky, T., Sekaly, R.** 1994. Subsets of HLA-DR1 molecules defined by SEB and TSST-1 binding. *Science.* 266: 1874-1878.
- Thomsen, A.C., Hansen, K.B., Møller, B.R.** 1983. Leukocyte counts and microbiologic cultivation in the diagnosis of puerperal mastitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 146: 938-941.
- Thomsen, A. C., Mogensén, S. C., Love-Jepsen, F.** 1985. Experimental mastitis in mice induced by coagulase-negative staphylococci isolated from cases of mastitis in nursing women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 64: 163-166.
- Thorberg, B. M., Kuhn, I., Aarestrup, F.M., Brandström, B., Jonsson, P., Danielsson-Tham, M.L.** 2006. Phenotype and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet. Microbiol.* 115: 163-172.
- Thygarajan, A., Burks, A.W.** 2008. American Academy of Pediatrics recommendations on the effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease. *Curr. Opin. Pediatr.* 20 (6): 698-702.
- Tissier, H.** 1900. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Paris: G. Carre and C. Naud.
- Tissier, H.** 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *C.R. Soc. Biol.* 60: 359-361.

- Tojo, R.,** Leis, R. 2003. Alimentos funcionales. Su papel en la nutrición preventiva y curativa. *Bol. Pediatr.* 43: 376-395.
- Tortora, G.J.,** Derrickson, B. 2008. *Introducción al Cuerpo Humano. Fundamentos de Anatomía y Fisiología.* Editorial Médica Panamericana, México DF.
- Trabazo, R.L.** 2005. Tendencias actuales en la formulación de alimentos para niños. *An. Pediatr. (Barc).* 3: 3-15.
- Tyson, J.E.,** Edwards W.H., Rosenfeld A.M., Beer A.E. 1982. Collection methods and contamination of bank milk. *Arch. Dis. Child.* 57: 396-398.
- Uehara, Y.,** Kikuchi, K., Nakamura, T., Nakama, H., Agematsu, K., Kawakami, Y., Maruchi, N., Totsuka, K. 2001. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1408-1413.
- Uhlig, H.H.,** Powrie, F. 2003. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J. Clin. Invest.* 112: 648-651.
- Uruakpa, F.O.,** Ismond, M.A.H., Akobundu, E.N.T. 2002. Colostrum and its benefits: a review. *Nutr. Res.* 22: 755-767.
- Van de Peer, P.** 2003. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine.* 21 (24): 3374-3376.
- van Odijk, J.,** Kull, I., Borres, M.P., Brandtzaeg, P., Edberg, U., Hanson, L.A., Høst, A., Kuitunen, M., Olsen, S.F., Skerfving, S., Sundell, J., Wille, S. 2003. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy.* 58 (9): 833-843.
- Vancanneyt, M.,** Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Björkroth, K.J., Franz, C.M., Foulquié Moreno, M.R., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F., Holzapfel, W.H. 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (3): 1381-1391.
- Vandecasteele, S.J.,** Peetermans, W.E., Merckx, R., Rinders, B.J., Van Eldere, J. 2003. Reliability of the *ica*, *aap*, and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 9: 114-119.
- Vanderhoof, J.A.,** Whitney, D.B., Antonson, D.L., Hanner, T.L., Lupo, J.V., Young, R.J. 1999. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J. Pediatr.* 135: 564-568.
- Vankerckhoven, V.V.,** Autgaerden, T.A., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H. 2004. Establishment of the PROSAFE collection of probiotic and human lactic acid bacteria. *Microbial Ecol. Health Dis.* 16: 131-136.
- Vaughan, E. E.,** Heilig, H.G., Ben-Amor, K., de Vos, W.M. 2005. Diversity,



- vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol. Rev.* 29 (3): 477-490.
- Vazquez-Torres, A.,** Jones-Carson, J., Baumber, A.J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W.T., Fang, F.C. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature.* 401: 804-808.
- Vontver, L. A.** 2007. Parto Normal. Cap. 10. En: *Obstetricia y Ginecología*. McGraw-Hill, México, pp 133-146.
- Vuong, C.,** Otto, M. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 4: 481-489.
- Walker, M.** 1999. *Mastitis. Lactation Consultant Series 2.* La Leche League Internacional. Schaumburg.
- Walter J.** 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (16): 4985-4996.
- Wang, M.,** Ahrne, S., Jeppsson, B., Molin, G. 2005. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 219-231.
- Wang, S.,** Ng, L.H., Chow, W.L., Lee, Y.K. 2008. Infant intestinal *Enterococcus faecalis* down-regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines. *World J. Gastroenterol.* 14: 1067-1076.
- Watanabe, I.,** Ichiki, M., Shiratsuchi, A., Nakanishi, Y. 2007. TLR2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity. *J. Immunol.* 178: 4917-4925.
- Watts, J.L.,** Owen, W.E. 1989. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 41: 1-4.
- Weaver, LT .** 1992. Breast and gut: the relationship between lactating mammary function and neonatal gastrointestinal function. *Proc. Nutr. Soc.* 51: 155-163.
- Weisman, L.E.,** Stoll, B.J., Cruess, D.F., Hall, R.T., Merenstein, G.B., Hemming, V.G., Fischer, G.W. 1992. Early-onset group B streptococcal sepsis: a current assessment. *J. Pediatr.* 121 (3): 428-433.
- West, P. A.,** Hewitt, J.H., Murphy, O.M. 1979. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 269-277.
- White, D. G.,** Harmon, R.J., Matos, J.E., Langlois, B.E. 1989. Isolation and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. *J. Dairy Sci.* 2: 1886-1892.
- Whitelaw, A.,** Sleath, K. 1985. Myth of the marsupial mother: Home care of very low birth weight babies in Bogota, Colombia. *Lancet.* 1: 1206-1208.
- Wickens, K. ,** Black, P.N., Stanley, T.V., Mitchell, E., Fitzharris, P., Tannock, G.W., Purdie, G., Crane, J.; Probiotic Study Group. 2008. A differential effect

- of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122 (4): 788-794.
- Wilde, C.J.,** Addey, C.V.P., Body, L.M., Peaker, M. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem. J.* 305: 51-58
- Wilde, C.J.,** Addey, C.V.P., Bryson, J.M., Finch, L.B.M., Knight, C.H., Peaker, M. 1998. Autocrine regulation of milk secretion. *Biochem. Soc. Symp.* 63: 81-90.
- Wirawan, R.E.,** Swanson, K.M., Kleffmann, T., Jack, R.W., Tagg, J.R. 2007. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology.* 153: 1619-1630.
- Wiswell, T.E.,** Bent, R.C. 1993. Meconium staining and the meconium aspiration syndrome. Unresolved issues. *Pediatr. Clin. North Am.* 40: 955-981.
- Wolochow, H.,** Hildebrand, G.J., Lamanna, C. 1966. Translocation of microorganism across the intestinal wall in rats: effect of microbial size and concentration. *J. Infect. Dis.* 116: 523-528.
- Wright, K. C.,** Fenny A.M. 1998. The bacteriological screening of donated human milk: Laboratory experience of British Paediatric Association's published guidelines. *J. Infection.* 36: 23-27.
- Wunderlich, P.F.,** Braun, L., Fumagalli, I., D'Apuzzo, V., Heim, F., Karly, M., Lodi, R., Politta, G., Vonbank, F., Zeltner, L. 1989. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing Enterococcus SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J. Int. Med. Res.* 17 (4): 333-338.
- Wüst, J.,** Rutsch, M., Stocker, S. 1995. *Streptococcus pneumoniae* as an agent of mastitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14: 156-157.
- Yahima, M.,** Nakayama, M., Hatano, S., Yamazaki, K., Aoyama, Y., Yajima, T., Kuwata, T. 2001. Bacterial translocation in neonatal rats: the relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 33 (5): 592-601.
- Yan, F.,** Polk, D.B. 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 20: 565-571.
- Yoon, B.H.,** Romero, R., Lim, J.H., Shim, S.S., Hong, J.S., Shim, J.Y., Jun, J.K. 2003. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189 (4): 919-924.
- Yoshinaga K .** 2008. Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19(2): 161-169.
- Yoshioka, H.,** Iseki, K., Fugita, K. 1983. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics.* 72: 317-321.

- Younes, H.,** Coudray, C., Bellanger, J., Demigne, C., Rayssiguier, Y., Remesy, C. 2001. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br. J. Nutr.* 86: 479-485.
- Zecconi, A.,** Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V., Piccinini, R. 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 40 (4): 177-183.
- Zhang S.,** Maddox C.W. 2000. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect. Immun.* 68: 1102–1108.
- Ziebuhr, W.,** Hennig, S., Eckart, M., Kranzler, H., Batzilla, C., Kozitskaya, S. 2006. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 28: S14-S20.
- Zoetendal E.G.,** Akkermans A.D.L., de Vos W.M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3854-3859.
- Zoetendal E.G.,** Akkermans A.D.L., Akkermans-van Vliet W.M., de Visser A.G.M., de Vos W.M. 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* 13: 129-134.
- Zoetendal, E.G.,** Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I., Gaskins, H.R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J. Nutr.* 134 (2): 465-472.
- Zoetendal, E.G.,** von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3401–3407.



